

FES
ZARAGOZA
U.N.A.M

ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL DE LA CIUDAD DE MÉXICO UTILIZANDO 20 LOCI STR.

Alumno: CRUZ AGUILAR JESÚS HUMBERTO

Núm. Cuenta: 304053698

Terminación de la carrera año 2011

Orientación: Bioquímica clínica

Lugar: Centro de Estudios e Investigaciones. ANIGEN

Opción de titulación: Tesis Experimental

Directora: QFB Ma. Lourdes Vega Navarrete

Asesora: Mtra. Leonor Aguilar Santelises



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Tabla de contenido

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	5
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	7
3. MARCO TEÓRICO.....	9
3.1 ADN	9
3.2 ORGANIZACIÓN DEL ADN.....	13
3.2.1 ¿Cómo es posible empaquetar al ADN?	14
3.3 HERENCIA	16
3.4 GEN.....	16
3.5 “DOGMA CENTRAL” de la biología molecular	17
3.6 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO	17
3.7 TIPOS DE POLIMORFISMOS.....	19
3.8 MARCADORES GENÉTICOS	20
3.9 MARCADORES GENÉTICOS FORENSES	20
3.10 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS.....	22
3.10.1 EXTRACCIÓN DE ADN	22
3.10.2 CUANTIFICACIÓN.....	23
3.10.3 AMPLIFICACIÓN DE LOCI STRs.....	24
3.10.3.1 PCR	24
3.10.3.2 ¿CÓMO FUNCIONA LA PCR?.....	25
3.10.3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PCR CON ESPECÍMENES FORENSES	26
3.10.4 SISTEMA DE ANÁLISIS DE STRs	27
3.10.5 ELECTROFORESIS CAPILAR.....	28
3.11 FRAGMENTOS DE ADN	29
3.12 GENÉTICA DE POBLACIONES	30
3.12.1 FRECUENCIAS GÉNICA Y GENOTÍPICA	31
3.12.1.1 LEY DE EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	31
3.12.1.2 PODER DE EXCLUSIÓN	32
3.12.1.3 PODER DE DISCRIMINACIÓN	32
3.12.1.4 PODER DE COINCIDENCIA	33

3.12.1.5	HETEROCIGOSIDAD	33
3.13	LOCUS DE ESTUDIO.....	34
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
5	OBJETIVOS	37
6	HIPÓTESIS.....	38
7	MATERIAL Y MÉTODO	39
7.1	TIPO DE ESTUDIO.....	39
7.2	CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS.....	39
7.3	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	40
7.3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
7.3.1.1	CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	40
7.3.1.2	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	40
7.3.1.3	CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	40
7.3.1.4	VARIABLES	40
7.3.2	EQUIPO	41
7.4	MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	42
7.5	AMPLIFICACIÓN.....	42
7.5.1	Condiciones de amplificación de los sistemas	44
7.6	ELECTROFORESIS CAPILAR.....	44
8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
9	RESULTADOS	48
9.1	RESULTADOS POBLACIONALES.....	48
9.1.1	POBLACIÓN.....	48
9.1.2	OTROS PARÁMETROS.....	48
9.1.3	EQUILIBRIO GENÉTICO	48
9.1.4	ELECTROFORESIS CAPILAR.....	49
9.1.5	FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	50
9.1.5.1	Locus D3S1358	50
9.1.5.2	Locus D1S11656	52
9.1.5.3	Locus D6S1043	54
9.1.5.4	Locus D13S317	56

9.1.5.5	Locus Penta E.....	58
9.1.5.6	Locus D16S539	60
9.1.5.7	Locus D18S51	61
9.1.5.8	Locus D2S1338	63
9.1.5.9	Locus CSF1PO	65
9.1.5.10	Locus Penta D	66
9.1.5.11	Locus TH01	68
9.1.5.12	Locus vWA	69
9.1.5.13	Locus D21S11	70
9.1.5.14	Locus D7S820	72
9.1.5.15	Locus D5S818	73
9.1.5.16	Locus TPOX	75
9.1.5.17	Locus D8S1179	76
9.1.5.18	Locus D12S391	78
9.1.5.19	Locus D19S433	80
9.1.5.20	Locus FGA	82
9.1.5.21	Frecuencia alélica poblacional.....	84
9.1.6	COMPARACIÓN CON PANELES ANTERIORES.....	89
10	DISCUSIÓN.....	90
11	CONCLUSIONES	93
12	SUGERENCIAS	94
13	REFERENCIAS.....	95
14	ANEXO	100
	DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	100

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
C	Citosina
CODIS	Banco nacional de perfiles de ADN
dNTP's	Desoxinucleótidostrifosfato
EC	Electroforesis capilar
FRLP	Fragmentos de restricción de longitud polimorfica
G	Guanina
LINES	Elementos interespaciadores largos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SINES	Elementos interespaciadores cortos
STR	Cortas repeticiones en tándem (short tándem repeat)
T	Timina
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem

1. RESUMEN

El análisis de ADN se ha convertido en una herramienta muy poderosa para la resolución de problemas de índole legal, ya sea la identificación humana, pruebas de paternidad, el reconocimiento de personas desaparecidas, etc.

En la actualidad los sistemas de justicia de México han adoptado el uso de nuevas tecnologías y métodos como apoyo en la impartición de justicia. Uno de estos es la utilización de paneles de nueva generación para la identificación humana; de mejor calidad y con un mayor poder de discriminación. Con anterioridad el sistema de justicia mexicano utilizaba paneles con hasta 16 marcadores, para la identificación humana, basados en el sistema CODIS (CombinedADNIndexSystem), creado por el FBI, sin embargo se ha desarrollado paneles con un número mayor de marcadores que les permiten tener mayor poder de discriminación, haciéndolos una mejor herramienta para la impartición de justicia.

El presente estudio se realizó con 200 muestras de sangre en papel FTA de voluntarios, sin consanguinidad y que habitan la Ciudad de México. Las muestras fueron analizadas por medio de electroforesis capilar con el panel PowerPlex 21® de Promega®. El análisis estadístico demostró que el panel, objeto de este estudio, presentó un poder de discriminación mucho mayor, comparado con paneles de generaciones pasados.

2. INTRODUCCIÓN

Es muy importante la caracterización de poblaciones para que los genetistas interesados en llevar a cabo la identificación de individuos, utilizando marcadores genéticos, tengan una base de datos que fundamente estudios estadísticos y así sea posible que la información derivada se interprete en forma adecuada.

En la actualidad, la comunidad de genética forense, ha puesto en uso los marcadores STR (Short Tandem Repeat), estandarizados y aprobados de la base de datos americana denominada CODIS (Combined ADN Index System), sin embargo, la capacidad de estos sistemas ya no es suficiente, ya que se han presentado evidencias de problemas en su utilización como herramientas de identificación.⁽¹⁰⁾

En el sistema de justicia mexicano se utilizan estos paneles de identificación como: PowerPlex® 16 System y AmpF/STR® Identifier, sin embargo este tipo de paneles ya no son suficientes para cubrir las necesidades del desarrollo forense en México dado el creciente número de casos de personas desaparecidas, ya que se han reportado casos de varios padres/madres para el mismo individuo. Es por eso que las empresas que diseñan este tipo de sistemas se han visto en la necesidad de desarrollar nuevos paneles capaces de remediar esta situación. Este es el caso de Promega® que recientemente lanzó el kit PowerPlex® 21 System, que cuenta con un mayor número de marcadores genéticos, haciéndolo un mejor sistema de identificación humana en virtud de que aumenta el poder de discriminación.⁽⁴²⁾

El presente estudio analizó el potencial de este nuevo kit: PowerPlex® 21 System, evaluando los cinco marcadores adicionales, que son distintos a los presentes en PowerPlex® 16 System y a los siete marcadores presentes en AmpF/STR® Identifier. Además, se realizó un estudio comparativo entre los paneles demostrando que este kit de nueva generación es mejor que sus antecesores.

El desarrollo experimental se basa en el análisis de STR's por medio de electroforesis capilar, para obtener el perfil genético de un individuo. Ya que se trata de un estudio poblacional, y tomando en cuenta que no se puede obtener el perfil de toda la población, se consideró una muestra de 200 individuos pertenecientes a la población de la Ciudad de México, seleccionados aleatoriamente.

Los perfiles genéticos obtenidos se analizaron estadísticamente para determinar el poder de exclusión y el poder de discriminación. Con el objetivo primordial de determinar la capacidad de identificación del kit PowerPlex® 21 System, además se comparará con los paneles de generación pasada, PowerPlex® 16 system o AmpF/STR® Identifier y se demostró que la utilización del panel de nueva generación beneficiará al sistema de justicia Mexicano.

3. MARCO TEÓRICO

Un organismo es un sistema capaz de autorreplicarse y autorrepararse, puede ser unicelular o pluricelular. Los organismos pluricelulares contienen diferentes tipos de células especializadas en el desarrollo de funciones específicas a diferencia de los organismos unicelulares, que como su nombre lo dice, son una sola célula capaz de llevar a cabo todas estas funciones.^(1,3,4)

Al igual que nosotros, cada célula que forma nuestro cuerpo puede crecer, reproducirse, procesar información, responder a estímulos y llevar a cabo una asombrosa variedad de reacciones químicas.^(1,2,3)

La célula está rodeada en su totalidad por la membrana plasmática, que forma una interfase dinámica entre el citoplasma y el espacio extracelular. Las células eucariotas poseen una ultraestructura compleja que incluye organelos con membranas, que se encargan de desarrollar funciones específicas. Dentro de estos organelos, por mencionar algunos: el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico, los ribosomas, etc., se encuentra el núcleo que es el encargado de coordinar los procesos metabólicos, la reproducción y la herencia, por lo cual se considera el centro de control de la célula. Es la estructura más grande, densa y visible dentro de la célula, constituyendo el control de esta. Todas las células contienen por lo menos un núcleo, exceptuando algunos casos, como los eritrocitos (carentes de núcleo) y los osteoclastos (células multinucleadas).^(1,5)

En el núcleo: se encuentra y replica el ADN, se transcribe, corta y empalma el ARN, además de otras muy importantes funciones como el intercambio selectivo y facilitado de moléculas con el citoplasma, como el ARN.⁽¹⁾

3.1 ADN

El ADN es de las moléculas más complejas conocidas por el hombre, su estructura contiene la información necesaria para poder controlar el metabolismo de un ser vivo. El ADN está constituido por unidades fundamentales, los desoxirribonucleótidos, también conocidos como bases, esto debido a que están constituidos por bases orgánicas cíclicas. Los nucleótidos están compuestos por tres partes:

- Un compuesto aromático cíclico que contiene átomos de carbono y de nitrógeno; por sus propiedades químicas, estos compuestos se denominan bases nitrogenadas.
- Un carbohidrato de cinco carbonos.
- Un grupo fosfato.

La formación de un nucleótido se produce mediante un enlace fosfodiéster en el que participan un grupo OH del ácido fosfórico y el H alcoholico del C5' de la pentosa del nucleósido, con pérdida de una molécula de agua. ^(1,2)

Las bases nitrogenadas son de dos tipos: pirimidinas y purinas. Las pirimidinas tienen un anillo de seis vértices; las purinas poseen anillos de cinco y seis lados fusionados.

Las bases púricas: Adenina y Guanina se derivan de la purina, mientras que las bases pirimidícas: Citosina, Uracilo y Timina se derivan de la pirimidina. (Figura 1).

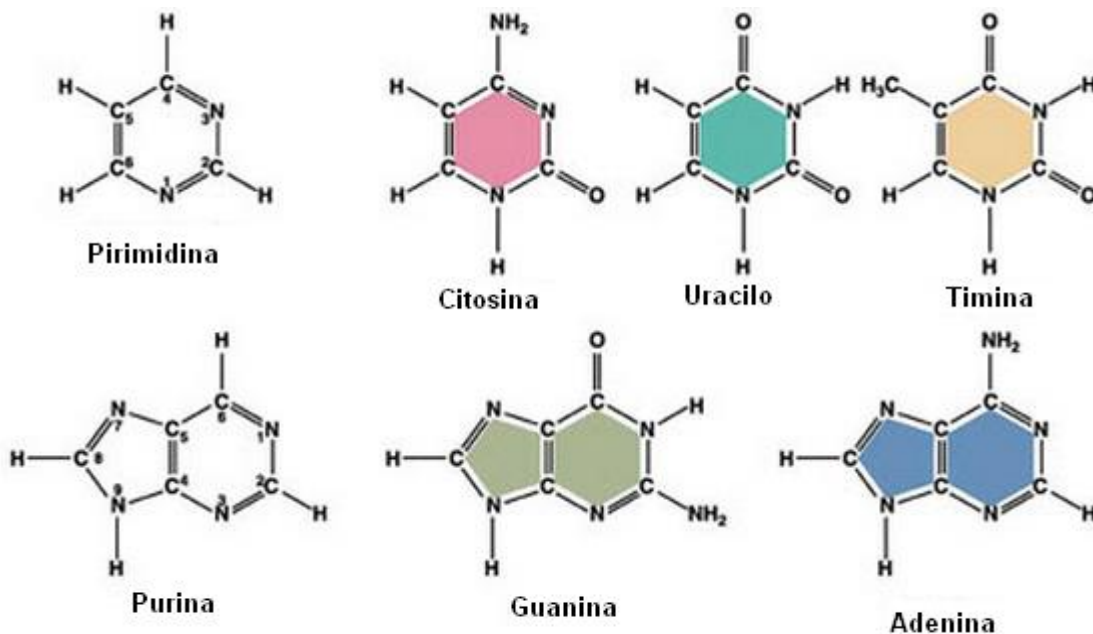


Figura 1. Precursores de las bases nitrogenadas. Bases nitrogenadas que componen la estructura del ADN. Modificado de Cultek.com ⁽⁶²⁾

Los nombres químicos de los nucleótidos son 5'-monofosfato de desoxiadenosina (o desoxiadenilato o DAMP), 5'-monofosfato de desoxiguanosina (desoxiguanilato o DGMP), 5'-monofosfato de desoxicitidina (desoxitidilato o DCMP) y 5'-

monofosfato de desoxitimidina (desoxitimidilato o DTMP). Sin embargo, por comodidad es más conveniente referirse a cada nucleótido por el nombre o abreviatura de su base A=adenina, G=guanina, T=timina, C=citosina y U=uracilo.^(4,5)

Los nucleótidos proporcionan los bloques a partir de los cuales se construyen los ácidos nucleicos. Los nucleótidos pueden unirse entre sí, mediante enlaces covalentes, para formar polímeros, es decir los ácidos nucleicos, el ADN y el ARN.^(5,8)

Dichas uniones covalentes se denominan uniones fosfodiéster. El grupo fosfato de un nucleótido se une con el hidroxilo de carbono 5' de otro nucleótido, de este modo en la cadena quedan dos extremos libres, de un lado el carbono 5' de la pentosa unido al fosfato y del otro el carbono 3' de la pentosa.

Gracias a los estudios realizados por científicos como Rosalind Franklin que con ayuda de rayos X demostró que el ADN tiene forma de hélice y Erwin Chargaff que gracias a sus estudios demostró la relación entre pirimidinas y purinas; Watson y Crick en el año de 1953; y otros importantes investigadores convergieron tres datos muy importantes:

- La difracción de rayos X mostró que el ADN tiene forma de hélice, que describía una vuelta completa cada 34 Å (3.4nm) y tenía un diámetro de aproximadamente 20 Å (2nm). Ya que la distancia entre nucleótidos adyacentes es de 3.4nm, debe haber 10 nucleótidos por vuelta.
- La densidad del ADN sugiere que la hélice debe estar formada por dos cadenas de polinucleótidos. El diámetro constante de la hélice se puede explicar si las bases de cada cadena se orientan hacia el interior y tienen una disposición restringida, de manera que siempre hay una purina opuesta a una pirimidina, evitando las asociaciones purina-purina (demasiado ancha) o pirimidina-pirimidina (demasiado estrecha).
- Independientemente de las cantidades absolutas de cada base, en el ADN la proporción de G y C siempre es la misma y la proporción de A y T también.

Con los cuales lograron deducir el modelo que postularon posteriormente.

Además de estos tres puntos propusieron que la doble hélice de las cadenas polinucleotídicas no están unidas por enlaces covalentes, sino asociadas por medio de puentes de hidrógeno formados entre las bases nitrogenadas y que se

acoplaba de manera antiparalela, es decir que para una cadena de polinucleótidos con orientación 5'-3' su cadena complementaria debe ser 3'-5'⁽⁶⁾(figura 2)

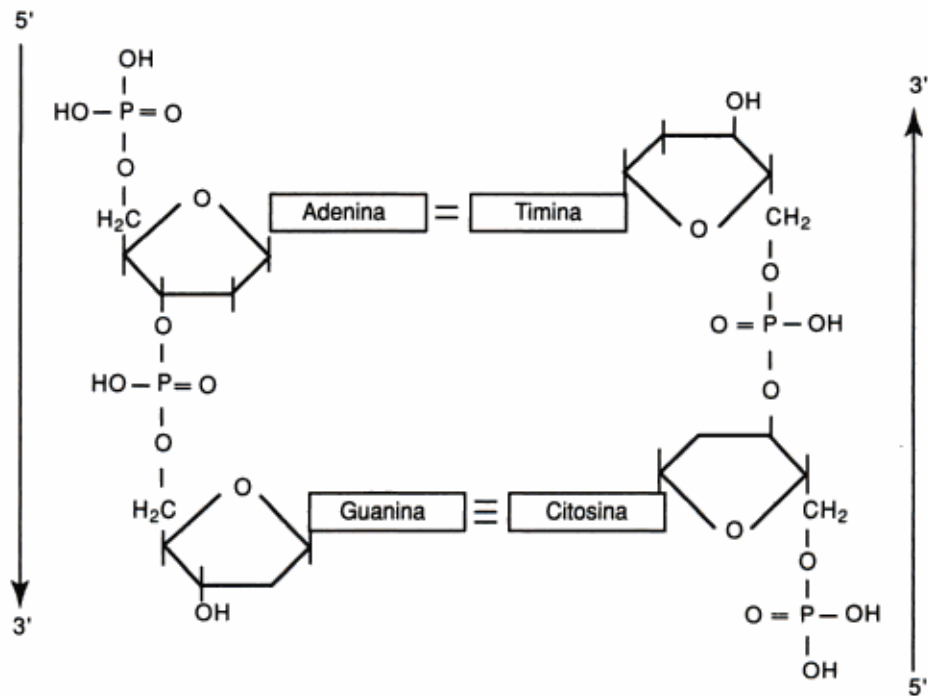


Figura 2. Nucleótidos unidos por puentes de hidrogeno y con orientación anti paralela. Tomado de Biología Celular y molecular.⁽¹⁾

La especificidad de los pares de base permite que, una vez separadas, cada una de las cadenas pueda actuar como molde para la síntesis de una cadena complementaria. Por medio de la enzima ADNpolimerasa, sobre el molde que es una de las cadenas simples, uno por uno los nucleótidos se unen, formando la nueva cadena complementaria e igual a la cadena que estaba anteriormente unida a la misma. De esta forma, la estructura del ADN contiene la información necesaria para perpetuar su secuencia.^(8,9,10)

3.2 ORGANIZACIÓN DEL ADN

La organización del material genético presenta tres niveles representativos de organización, que son:

- Estructura primaria: corresponde a la secuencia de bases.
- Estructura secundaria: emparejamiento antiparalelo de las bases.
- Estructura terciaria: conformación espacial de la molécula en su conjunto.

En la sección anterior se mostraron los componentes esenciales del ADN, su ubicación en las células y algunas de sus propiedades, sin embargo, es de gran interés mencionar su organización, ya que es de suma importancia comprender como se logra almacenar tanta información en un espacio tan reducido.

El ADN que se encuentra en el núcleo de las células se empaqueta en cromosomas, que son paquetes densos de ADN compactados con proteínas de protección llamadas histonas. El genoma humano consiste de 22 pares de cromosomas autosómicos y dos cromosomas sexuales, esto quiere decir que en una célula normal contiene 46 diferentes cromosomas o 23 pares de cromosomas. Las mujeres se distinguen por presentar dos cromosomas X y los hombres un cromosoma X y uno Y en el par 23. ⁽⁴⁾

Dentro de todas las células somáticas, los cromosomas están en estado diploide, esto quiere decir en pares, mientras que en las células gaméticas se encuentran en estado haploide, quiere decir que solo contienen la mitad de los cromosomas que poseen una célula somática (23 cromosomas).⁽⁶⁾ Los cromosomas no poseen un grosor uniforme en toda su longitud, que presentan un centrómero, que es una constricción o porción más estrecha, responsable del movimiento de los cromosomas durante la división celular. El centrómero divide al cromosoma en dos brazos: “p” el brazo corto y “q” el largo. Esta nomenclatura y las técnicas de citogenética, como el bandeo cromosómico, permitieron ubicar y ordenar por regiones los genes a lo largo de cada cromosoma. ^(5,7)

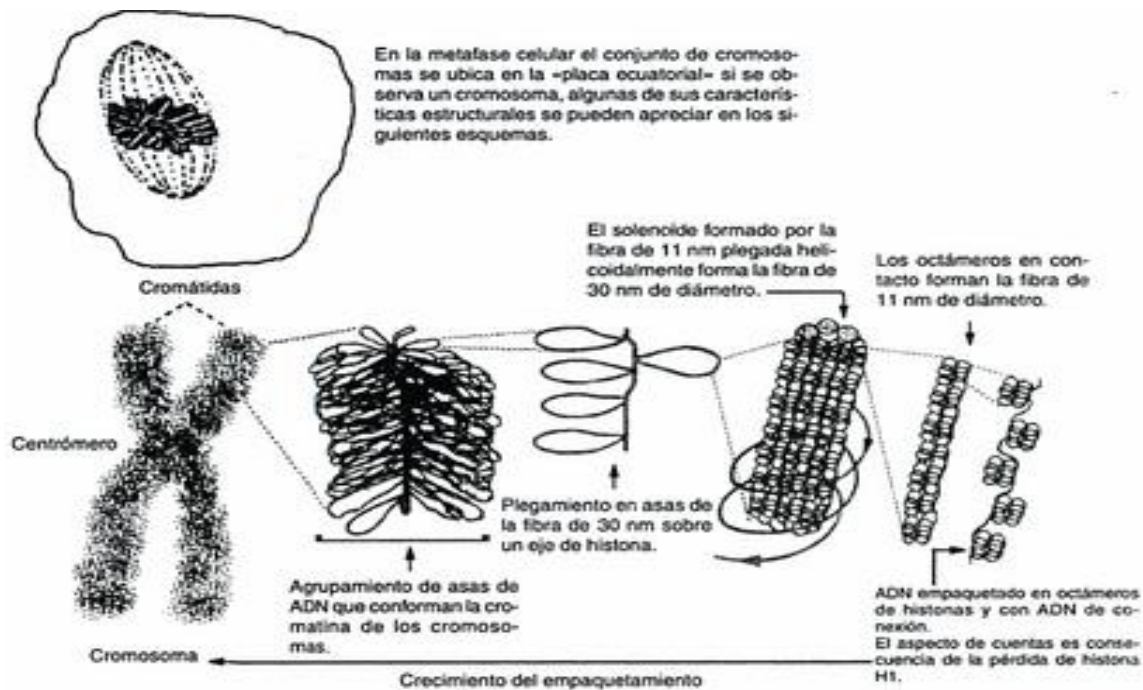


Figura 3. Las partes de un cromosoma. Tomado de Identificación por ADN. ⁽⁷²⁾

3.2.1 ¿Cómo es posible empaquetar al ADN?

El empleo de microscopia electrónica permitió estudiar de forma más detallada a la cromatina que consiste en el empaquetamiento del ADN con proteínas, formando un complejo que resulta más manejable y compacto en la célula. El componente proteico principal de la cromatina son las histonas, son proteínas básicas con carga parcial positiva, ricas en residuos de lisina y arginina,

desempeñan un papel importante en la fijación del esqueleto azúcar-fosfato que tiene carga negativa. ^(3,8,9)

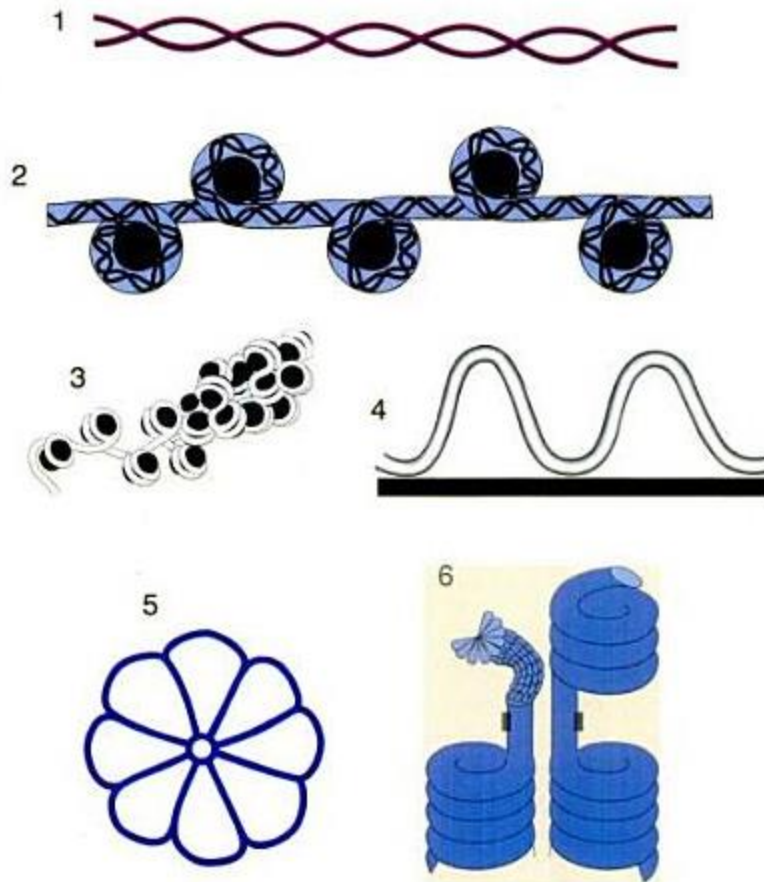


Figura 4. Ordenes sucesivos de empaquetamiento del ADN hasta la cromátida del cromosoma metafásico, 1: ADN; 2, orden nucleosómico; 3, solenoide de 30 nm; 4, lazos de fibras cromatínicas; 5, agrupación de lazos; 6, enrollamiento de cromátidas y zona centromérica. ⁽⁷⁰⁾

Se determinó que el primer paso en la condensación del ADN es la formación de nucleosomas, estructuras similares a las cuentas de un collar que contienen dos vueltas de ADN y son la parte fundamental de la cromatina. Cada nucleosoma está compuesto por las histonas o nucleoproteínas que son: 2a, H2B H3 y H4, que forman un octámero de aproximadamente 146 pares de bases nitrogenadas, los nucleosomas adyacentes están separados por un ADN de enlace de 54pb y unidos por una quinta histona llamada H1 lo que genera que la condensación sea mucho mayor y forma una fibra de 30nm de diámetro, así la cromatina queda condensada 8000 veces en relación con el ADN extendido de forma natural. ^(5,7, 8)

3.3 HERENCIA

El ADN de los cromosomas se compone de regiones codificantes y no codificantes, las regiones codificantes se conocen como genes y contienen la información necesaria para que la célula produzca proteínas. El gen es la unidad de la herencia; se define como “una secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN) que contiene la información necesaria para la síntesis de una macromolécula con función celular específica, habitualmente proteínas pero también ARNm, ARNr y ARNt”.⁽⁶⁷⁾

Se estima la existencia de unos 32,000 genes, que en total constituyen aproximadamente el 10% del ADN, se desconoce en su totalidad la función del ADN restante. Los genes son una entidad estable, sin embargo, están sujetos a cambios ocasionales de secuencia: mutaciones: estas pueden tener efectos negativos o no; o simplemente no detectarse en el fenotipo a pesar de su presencia genotípica.^(10, 67)

3.4 GEN

El gen posee varias partes funcionales, que controlan su actividad. Se dividen en tres grupos:

- El promotor: que señala el nucleótido en el que el gen comienza a transcribirse y el sitio donde inicia la transcripción.
- Secuencias reguladoras: determinan el momento en que el gen comienza a transcribirse y cuántas veces debe hacerlo en un tiempo dado, de estos hay dos tipos: los amplificadores y los inhibidores.
- Finalmente en la cercanía del extremo 3' del segmento codificador, el gen posee una sección de ADN llamada secuencia de terminación.^(7,8,9)

Los genes consisten de exones (partes codificantes de proteínas) e intrones (partes no codificantes). Los intrones se encuentran intercalados entre los segmentos que codifican, los exones. Los intrones son secuencias que no codifican para proteínas. Estas secuencias, que probablemente constituyen la

mayor parte del ADN, se someten a presiones evolutivas de carácter diferente a las impuestas por la necesidad de codificar una secuencia de aminoácidos, debido a esto se les ha denominado ADN “basura”, sin embargo como se verá más adelante, esto no es cierto, su utilidad va más allá de lo que se puede apreciar.^(7,8,9)

3.5 “DOGMA CENTRAL” de la biología molecular

El sistema de códigos utilizado por las células se basa en el orden en que se encuentran los nucleótidos en el ADN, que determina la secuencia de los nucleótidos en el ARN, y por ende la secuencia de los aminoácidos en la proteína.

La síntesis del ARN, usa como molde el ADN; esto se denomina transcripción, mientras que la síntesis de la proteína cuyo molde es el ARNm, se denomina traducción.

El código genético, define la relación entre secuencias de tres nucleótidos, llamadas codones, cada uno de los cuales representa un aminoácido. Un gen contiene una serie de codones, que se leen en serie desde el punto de inicio, situado en un extremo, hasta el punto de terminación situado al otro extremo.⁽⁸⁾

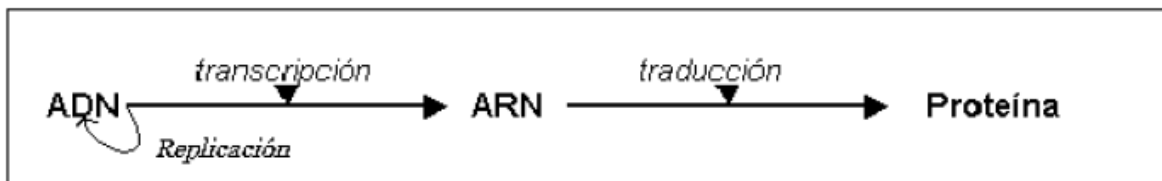


Figura 5. Dogma central de la biología molecular. ⁽⁶⁷⁾

3.6 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA HUMANO

El ADN codificante, a pesar de ser más interesante desde el punto de vista médico, posee poca variabilidad entre las personas, con excepción de ciertas regiones como la del sistema HLA.

Como se mencionó, el ADN “basura” o repetitivo, son secuencias repetidas cortas en forma de copias idénticas o parecidas. Este ADN es altamente polimórfico por lo que tiene una gran aplicación en la identificación de individuos y se clasifica en:^(10, 12, 53,55)

- ADN repetido en tándem, que se divide en varios grupos según el tamaño total que origina la repetición:
 - ADN satélite (llamado así porque al separar el ADN genómico en gradientes de densidad aparece como tres bandas “satélites” de la banda principal). El ADN satélite está formado por la repetición de una secuencia de ADN miles de veces en tándem, es decir copias consecutivas. Esto da lugar a regiones repetidas con tamaños que van desde 100kb hasta varias megabases.
 - El ADN minisatélite; los bloques de secuencia de este ADN poseen un tamaño aproximado entre 0.1 y 40 kb y la unidad de repetición es de 10 a 100 pb. Los minisatélites se distribuyen al azar en el genoma humano, se localizan preferentemente en las regiones subterminales de los cromosomas; son las implicadas en los fenómenos de recombinación.

Los satélites y minisatélites entran en la categoría de VNTRs (“variable Number of Tandem Repets”), haciendo alusión a la variación en el número de unidades de repetición de cada fragmento.

- Las regiones de ADN con unidades de repetición de 2 a 6 pb se denominan microsatélites o STRs (*Short tandem repeats*)
- ADN repetitivo disperso: formado por secuencias que se repiten miles de veces en el genoma humano, pero no en tándem, sino de manera dispersa y se clasifican en función de:
 - Los SINEs (short Interspersed Nuclear Elements) o elementos nucleares dispersos cortos: conforman aproximadamente un 13% del genoma humano; el principal SINE es la familia de elementos Alu, que es específica de los primates y constituye un 10% de nuestro genoma.
 - Los LINE (Long Interspersed Nuclear Elements) o elementos nucleares dispersos largos; constituyen un 20% del genoma humano. Son secuencias con un tamaño de varias kilobases, agrupados en distintas familias. El

principal LINE es el llamado LINE-1 ó L1, formado por una secuencia de unas 6 kb repetida unas 800,000 veces en el genoma. Estos elementos, al contrario que los SINE, no son ricos en G+C y se localizan predominantemente en las bandas G de los cromosomas.

- Existen otras familias, como la “Non transcribedSpacer” (NTS) que se localiza en el primer lugar en la región homónima del ADN ribosómico.^(10, 12, 53,55)

3.7 TIPOS DE POLIMORFISMOS

Se define polimorfismo como la frecuencia en la población de dos o mas formas alternativas y distintos fenotipos que resultan de la variación alélica en un locus. En otras palabras, expresa la variabilidad que existe dentro de un fragmento de ADN. Como regla general, cuantos mas alelos haya, mayor polimorfismo y por ende, mayor poder de identificación.^(69, 70)

El análisis detallado del genoma humano, ha revelado numerosas categorías de secuencias de ADN no codificante, muchas de las cuales son diversas formas de ADN repetitivo.

El polimorfismo del ADN se determina por regiones hipervariables, que involucran un cambio de base o un número determinado de bases repetidas en tándem o secuencias específicas de diversas longitudes; estos polimorfismos tienen una gran variedad de alelos existentes.

Los polimorfismos pueden ir desde la modificación de una sola base, hasta cambios en el número y tamaño de las unidades de repetición y son de dos tipos:

- Polimorfismos de secuencia. Se producen por el cambio de uno o más nucleótidos en una secuencia de ADN y se presentan en el ADN codificante.
- Polimorfismos de longitud. Se presentan por la inserción o delección de uno o más nucleótidos, es el más abundante de ADN repetitivo mini y microsatélite.^(10, 12, 13)

3.8 MARCADORES GENÉTICOS

El objetivo de los marcadores genéticos es determinar que alelos están presentes en un *loci* genéticamente variable.

Una clara ventaja de la determinación de los genotipos de los diversos marcadores genéticos es el potencial de detectar variación genética más allá de la que resulta de un cambio sobre una propiedad física.

A cada una de estas regiones polimórficas que se estudian en genética forense se les ha llamado “marcador genético”, “sistema” o “locus” (loci en plural). Las diferentes formas alternativas en las que un marcador puede manifestarse se denominan alelos. Cuantos más alelos (posibilidades) tenga un marcador genético, mejor resultará para diferenciar entre unas personas y otras.^(9,10)

3.9 MARCADORES GENÉTICOS FORENSES

Ya que la variabilidad genética se debe a variaciones en la secuencia del genoma, podríamos decir en un sentido que el término diversidad sin llegar a ser sinónimo está estrechamente ligado al de polimorfismo.⁽⁹⁾

Los marcadores genéticos adoptados en el área legal y forense deben ser polimórficos, es decir, que se encuentren más de dos alelos de un gen en particular dentro de una población determinada. Se dice que un locus es polimórfico si las frecuencias de los alelos más comunes son menores del 95%.⁽¹³⁾

Los grupos sanguíneos fueron los primeros marcadores en emplearse en el sistema forense, sin embargo, tienen la desventaja de que no presentan un alto polimorfismo, la tipificación se realiza con antisueros y en ocasiones se dificulta la identificación del grupo cuando la cantidad de muestra es relativamente pequeña o de mala calidad.⁽¹¹⁾

En la actualidad y a partir de la invención de la PCR (polymerase chain reaction) se logró hacer el análisis de los minisatélites y microsatélites a partir de muestras biológicas, que hasta entonces no se podían analizar.⁽¹⁰⁾

De todos los polimorfismos analizables por PCR, los de mayor interés forense, pertenecen a los mencionados en el párrafo anterior. Ambos son particularmente útiles por que son altamente polimórficos y presentan un alto grado de heterocigosidad, dado que estos polimorfismos se deben a diferencias en el número de repeticiones de una secuencia específica que presentan los distintos alelos, se pueden detectar por medio de la PCR y electroforesis capilar.

La gran ventaja de los STRs sobre otros marcadores, son su estabilidad y la posibilidad de realizar PCR multiplex, amplificando varios loci simultáneamente. Además su análisis se ha facilitado con el uso de fluorocromos y secuenciadores automáticos de ADN. ⁽¹⁰⁾

Los más abundantes y fáciles de amplificar son los que contienen 2 pb como unidad de repetición, pero presentan ciertos problemas técnicos, como la presencia de bandas inespecíficas generadas durante la amplificación, hacen que se utilicen principalmente STRs con repeticiones de 4 pb más apropiados para fines forenses ^(10, 12)

La utilización de ADN microsatélite presenta grandes ventajas frente a los sistemas de ADN satélite y ADN minisatélite.

- La aplicación de la técnica de PCR, permite obtener varios millones de copias de un fragmento determinado de ADN en un tiempo de 2 ó 3 horas, lo que permite analizar muestras cuya cantidad de ADN es escasa.
- El tamaño de los productos amplificados es pequeño (100-500pb) de forma que es posible obtener resultados a partir de ADN sumamente degradado cuyos fragmentos son aproximadamente 1000pb.
- El tiempo necesario para completar los análisis es muy corto, mucho más que la técnica empleada en el análisis de ADN minisatélite y además con menor costo.
- Los sistemas STRs revelan alelos que se definen con precisión, es decir, son variables discretas, esto permite simplificar el análisis estadístico de las frecuencias alélicas en las poblaciones y por otro lado, es mucho más fácil la estandarización y la comparación de los resultados entre los diferentes laboratorios. ^(10,12,13)

3.10 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS

Estos son los diferentes pasos de los que consta un análisis completo de ADN:

1. Extracción del ADN.
2. Cuantificación del ADN extraído.
3. Estudio de las regiones hipervariables por:
 - Amplificación por PCR.
 - Secuenciación de los STRs.
4. Análisis automatizado de los STRs.

3.10.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Cuando se obtiene una muestra biológica de una escena del crimen es muy común que la muestra esté en mal estado, sea muy poca o esté contaminada, existen muchas otras razones por las cuales la muestra se considera de mala calidad, aunado a esto sabemos que la molécula de ADN no viene sola, sino que cuenta con la presencia de proteínas que lo protegen del medio ambiente y lo empaquetan, lamentablemente también contribuyen a la dificultad del análisis genético. Sin embargo, en la actualidad se han diseñado nuevas técnicas capaces de realizar la separación de la molécula de ADN de todos estos factores de interferencia. Entre las que se encuentran: la extracción orgánica, extracción con Chelex y con papel FTA.^(14, 25)

La extracción orgánica, también se conoce como extracción fenol-cloroformo, se utilizó por mucho tiempo y se sigue utilizando en situaciones en donde se requiera tipificación por RFLP o PCR. El ADN de alto peso molecular es esencial para métodos RFLP, y se puede obtener más eficientemente por este tipo de extracción.^(14,25)

El método Chelex de extracción para ADN es más rápido que la extracción orgánica. Sin embargo, este proceso involucra la obtención de ADN de una sola cadena y por esto es solamente una herramienta para procedimientos de amplificación por PCR.

FTA™ es un papel absorbente a base de celulosa que contiene sustancias químicas patentadas, para proteger las moléculas de ADN de la degradación de las nucleasas y preservar el papel de contaminación bacteriana. Como resultado el ADN en el papel FTA™ es estable a temperatura ambiente durante un periodo de muchos años. Las células se lisan al contacto con el papel y el ADN de los leucocitos queda inmovilizado en la matriz del papel.⁽²⁵⁾

Anteriormente con este método debía seguirse una serie de pasos para el lavado del papel FTA™, sin embargo en la actualidad los nuevos paneles empleados para la amplificación por PCR cuentan con sustancias que evitan la inhibición causada por los componentes sanguíneos.

En la actualidad se cuenta con técnicas como la extracción diferencial; que ofrece la posibilidad de resolver las mezclas de semen con otros fluidos biológicos procedentes de la víctima (fluidos vaginales, sangre o saliva): este método se basa en la resistencia de los espermatozoides a la lisis con detergente y proteinasa k en ausencia de un agente reductor.^(10, 12, 25)

En los laboratorios forenses de última generación se han implementado técnicas que ayudan a la purificación de ADN en muy poco tiempo, este es el caso del equipo llamado Maxwell® cuyo funcionamiento se basa en el uso de una resina con carga positiva a la que se adherirá el ADN y mediante una serie de lavados en amortiguador de lisis; se obtiene el ADN libre de partículas que pudiese evitar su posterior análisis.⁽⁶⁶⁾

3.10.2 CUANTIFICACIÓN

Una vez obtenido el ADN por medio de la extracción y su purificación, es necesario saber qué cantidad de ADN se tiene y cuál es la calidad del mismo. La determinación de la cantidad de ADN en una muestra es esencial para la técnica de PCR porque es estrecho el rango de concentración para trabajar mejor, ya que se encuentran dos situaciones, que la concentración sea insuficiente, que en dado caso habría resultados por debajo de la escala de la técnica de medición y por el lado contrario si la concentración es muy alta, pueden resultar picos que salen fuera de la escala de la técnica de medición.

Actualmente el método de elección para la cuantificación es la fluorescencia, en donde por medio de sondas marcadas fluorescentemente se detecta el número de copias obtenidas por cada ciclo de la reacción, ya sea con el aumento de la fluorescencia o la disminución, esto dependiendo del sistema que utiliza.^(10, 12)

3.10.3 AMPLIFICACIÓN DE LOCI STRs

La tipificación de los microsatélites o loci STR comienza con la amplificación de dichos loci. La reacción en cadena de la polimerasa es la técnica apropiada para este caso ya que tiene la capacidad para amplificar dos o más loci STR simultáneamente en una sola reacción, a este procedimiento se le denomina PCR múltiplex.

3.10.3.1 PCR

PolymeraseChainReaction (PCR), es un poderoso procedimiento que se utiliza para la amplificación del ADN para obtener grandes cantidades de una secuencia específica de ADN *in vitro*. El constituyente más importante de la PCR es un par de oligonucleótidos sintéticos (*primers*), estos son complementarios de la región que se quiere amplificar. Después del reconocimiento de la muestra de ADN, los *primers* deben tener sus extremos 3'-hidroxilo orientados uno hacia el otro.^(10, 12, 25)

La PCR es especialmente útil en la detección de enfermedades genéticas tales como la fibrosis quística, la hemofilia clásica y las distrofias musculares Duchenne/Becker.

Esta técnica ha tenido un impacto mayúsculo en la medicina forense, en investigación criminal, como parte de la tecnología de la “huella digital” del ADN. Gracias a su aplicación, es posible excluir o incriminar a sospechosos utilizando muestras extremadamente pequeñas de material biológico encontrado en el lugar de los hechos.^(41,42)

La PCR permite estudiar no sólo organismos vivos, sino también sus restos fósiles, congelados o momificados. También puede servir para medir la expresión de un determinado gen. Para ello se extrae ARN mensajero, se retrotranscribe con la que se obtiene un ADNc, y éste se utiliza como material de partida para la amplificación.⁽³³⁾

3.10.3.2 ¿CÓMO FUNCIONA LA PCR?

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades muy pequeñas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos que eran indispensables antes de su invención.

El proceso consta de aproximadamente una treintena de ciclos, que se pueden modificar según las características del material a analizar. Cada ciclo consta de tres pasos: el primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco (material a analizar). En el segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco, con los denominados “primers” (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambos tipos de ADN. Esta temperatura dependerá de la temperatura de fusión (T_m) de los *primers*, y oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena molde.^(10, 12)

Para realizar la PCR se necesita una mezcla que contenga: la secuencia a amplificar, ambos *primers* que se alinearán a las cadenas sencillas del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósido trifosforados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 μ L) como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable.⁽¹⁰⁾

El componente más importante de una PCR son los dos *primers*, estos son secuencias cortas de ADN que preceden la región que se quiere copiar. Un *primer* actúa identificando la secuencia del ADN que se desea copiar. Estos son oligonucleótidos sintetizados químicamente, que se adicionan en gran concentración, relativamente con el ADN molde, que conducirá la PCR.

Templado (muestra de ADN); una característica de la técnica es que la cantidad y calidad de la muestra que se sujetará a la amplificación no necesita ser alta. Una sola célula, un lisado celular crudo o especímenes con una longitud promedio de

unos pocos cientos de pares de bases generalmente son adecuadas para una amplificación exitosa.⁽¹⁰⁾

Enzima: sólo se pueden utilizar polimerasas con actividad a las altas temperaturas de la reacción, esto debe aclararse, ya que, cuando comenzó el desarrollo de la técnica, se utilizaban polimerasas que no resistían las altas temperaturas, haciendo más difícil el proceso de la técnica, un claro ejemplo de esto es la polimerasa de *E. coli*, sin embargo en la actualidad se cuentan con enzimas capaces de amplificar el ADN en la reacción sin ninguna dificultad. Dos enzimas de uso muy extendido son la taq, que proviene de la bacteria *Thermusaquaticus* y la Vent de la bacteria *Thermuslitoralis*. Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72°C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por arriba de 92°C.⁽¹⁰⁾

El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la Taq polimerasa, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa.

La concentración óptima de MgCl₂ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg ya que un exceso del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

3.10.3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PCR CON ESPECÍMENES FORENSES

Las ventajas de la amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa para la evidencia biológica son las siguientes:

- El ADN degradado en fragmentos de solamente unas pocas pares de bases de largo se puede amplificar perfectamente.
- Se pueden amplificar simultáneamente un gran número de copias de varias secuencias específicas de ADN por PCR múltiplex.
- El ADN contaminante procedente de hongos o bacterias, no se amplifica porque los primers que se utilizan son humano-específicos.

- Los kits comerciales están disponibles para facilitar la reacción de amplificación por PCR en un solo paso.

Existen tres potenciales situaciones que se pueden considerar como desventajas de la PCR:

- La región flanqueada de ADN no se amplifica debido a la presencia de inhibidores de la PCR en el templado extraído de ADN.
- La amplificación puede no llevarse a cabo si el primer no se une al ADN (alelos inválidos), y
- La contaminación de otro ADN humano también de evidencia forense que se esté trabajando al parejo o de muestras amplificadas previamente debido al descuido técnico en el laboratorio e invalidación de los protocolos.^(10,11, 72)

3.10.4 SISTEMA DE ANÁLISIS DE STRs

Con la técnica de PCR se amplifican los STRs de interés, sin embargo es necesario un método para identificarlos.

Para la distinción de varias moléculas entre una y otra, primeramente se lleva a cabo una separación para extraer los diferentes tamaños de los fragmentos de amplificación. Anteriormente la técnica empleada se basaba en el uso de geles, sin embargo, actualmente la técnica de mayor uso es la electroforesis capilar; que cuenta con el mismo principio que la electroforesis en gel.

El proceso de electroforesis se refiere a someter los amplicones a la carga eléctrica. Los grupos fosfato del esqueleto de la molécula de ADN tienen carga negativa. Con la influencia de una corriente eléctrica, las moléculas de ADN van a migrar del electrodo negativo, conocido como el cátodo, hacia el electrodo positivo, conocido como ánodo.⁽¹²⁾

3.10.5 ELECTROFORESIS CAPILAR

Técnica singular que surge con un gran potencial para incrementar la rapidez en la tipificación del ADN por el hecho de que se ha automatizado.

EC o electroforesis capilar es el nombre que recibe el transporte de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico a través de un capilar que tiene como soporte un polímero. Con esta técnica las partículas con carga se separan por sus diferentes velocidades de migración cuando se les aplica un gradiente de potencial. Las velocidades de migración son función de la densidad de carga por lo que se podrán separar unas partículas de otras con un arreglo de esta propiedad. A su vez, la densidad de carga de la partícula será función de una serie de parámetros que marcan las condiciones experimentales de la electroforesis. pH, fuerza iónica; gradientes de voltaje; interacción con el soporte. ^(10, 12)

Existen diferentes plataformas de detección de fluorescencia para determinar alelos STR. Actualmente los métodos de detección más comunes para el análisis de STR son los Analizadores Genéticos ABI, que cuentan con varias versiones, pero que tienen el mismo fundamento que es la electroforesis capilar. ^(10, 12)

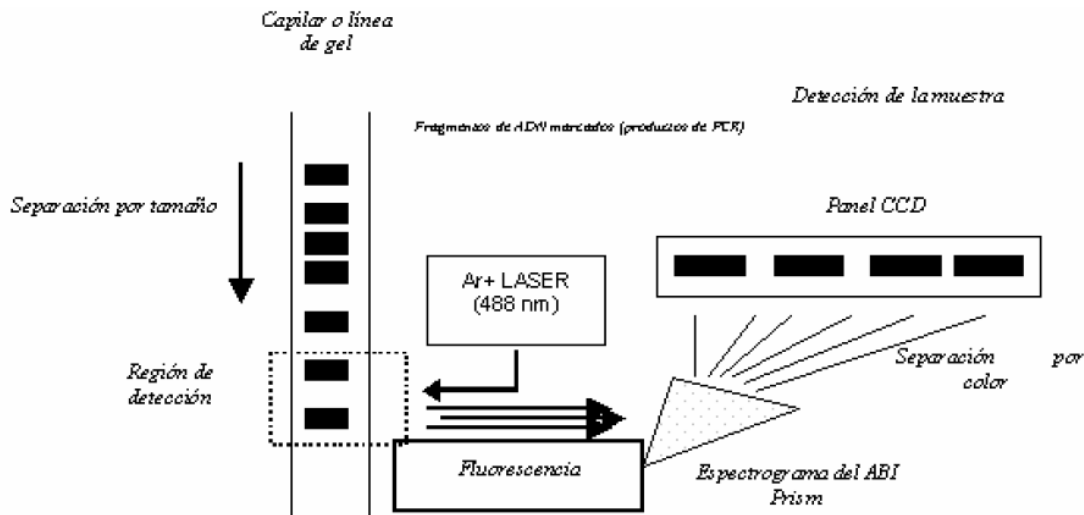


Figura 6. Esquema de la partes del secuenciador ABI prism 3100-avant. Tomado de Butler ⁽¹⁰⁾

3.11 FRAGMENTOS DE ADN

Los fragmentos de ADN representados por picos en la electroforesis capilar, se comparan con un estándar que se mezcla con las muestras de ADN. Este estándar se marca con diferentes colores de fluoróforos que se distinguen espectralmente los fragmentos de ADN de tamaño desconocido.

Después de la lectura de las muestras junto con el estándar, los datos se analizan por un software, muy sofisticado, encargado de determinar el genotipo de cada muestra por comparación del tamaño de los alelos observados dentro del marcador alélico para eso obtener los alelos del locus analizado de la muestra problema de ADN.

El objetivo de calibrar los fragmentos de ADN con el estándar interno es saber el valor de la molécula que se está midiendo para así poder asignar una etiqueta. Este proceso se basa en un algoritmo que ayuda a determinar la proporción de los fragmentos de ADN y es conocido como método Southern (meridional). Este método usa el tamaño de dos picos conocidos y en medio uno desconocido. ^(10,12)

El método meridional o southern funciona muy bien para la determinación exacta de la longitud de fragmentos de ADN sobre un intervalo de 100-450 pb cantidad necesaria para los alelos STR.(Figura 7)⁽¹⁰⁾

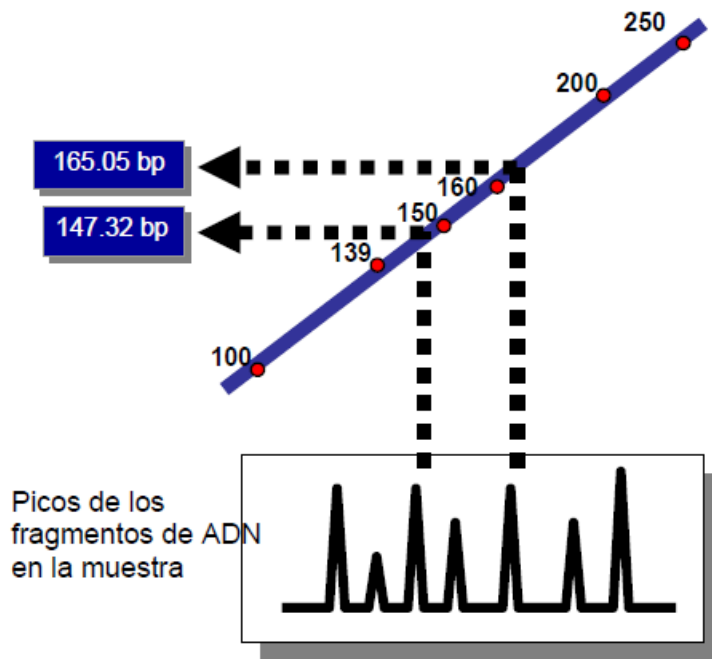


Figura 7. Ejemplo del método meridional o southern, utilizado en la determinación de longitud de fragmentos. Tomado de Butler ⁽¹⁰⁾

3.12 GENÉTICA DE POBLACIONES

Los estudios de la herencia a nivel individual han demostrado un definido comportamiento de los genes, con proporciones derivadas de la segregación, transmisión y combinación independiente de los mismos. ⁽⁵⁶⁾

Sin embargo, los individuos no son entidades aisladas, se agrupan en poblaciones. Aunque los genes existen dentro de los individuos y no cambian su comportamiento mendeliano. El destino de esos individuos y por lo tanto de sus genes se halla fuertemente ligado a los factores que afectan a la población como un todo.

¿Qué estudia la genética de poblaciones?

- La variación genética dentro y entre poblaciones y su cambio en el tiempo y espacio.
- La constitución genética: tipos de alelos que portan los individuos.

- Las frecuencias genotípicas: frecuencias de los genotipos resultantes de la combinación de los alelos de cada locus.
- Acervo genético: es la suma de todos los genotipos de los individuos de una población.^(55, 56, 57)

3.12.1 FRECUENCIAS GÉNICA Y GENOTÍPICA

Para que una población sobreviva, debe transmitir sus genes a la descendencia; para ello, los genotipos se disocian durante la meiosis y los individuos transmiten sus alelos a través de sus gametos.

La frecuencia genotípica es la cantidad de veces que aparece el genotipo en una población.

Con la progenie se reconstruyen los genotipos, esto significa que los genotipos de los progenitores no tienen continuidad, los que tienen continuidad son los alelos.

La frecuencia de un alelo se define como el número de copias del alelo en la población, dividido por la suma de todos los alelos en esa población.

El cálculo de las frecuencias alélicas de una población se hace teniendo en cuenta que los homocigotos tienen dos alelos idénticos y los heterocigotos dos alelos diferentes donde: la probabilidad para un heterocigoto, o sea, que tenga ambos alelos en un solo locus es:

$$P=2pq,$$

Mientras que para un individuo homocigoto la probabilidad del genotipo es: $P=p^2$

3.12.1.1 LEY DE EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

El equilibrio de Hardy-Weinberg establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe la selección natural, ni ningún otro factor y no se produzca ninguna mutación. Es decir, la herencia mendeliana, por si misma, no engendra cambio evolutivo.

El modelo utiliza los principios mendelianos de la segregación y de la probabilidad simple para explicar las relaciones entre frecuencias alélicas y genotípicas en una población.

La ley de Hardy-Weinberg utiliza las frecuencias reales de los alelos de una población para predecir las frecuencias genotípicas esperadas de ésta; es decir, el número de genotipos que deberían tener lugar en la población.^(10,54)

De tal manera que si se sabe que un gen consta de dos alelos A y a, (cuyas frecuencias se representan como p y q) que pueden formar tres genotipos: AA, Aa y aa, se pueden utilizar las siguientes fórmulas para el cálculo de las frecuencias genotípicas esperadas:

- Frecuencia de AA= $p \times p = p^2$
- Frecuencia de Aa= $2 \times p \times q = 2pq$
- Frecuencias de aa= $q \times q = q^2$
- No haya mutación

3.12.1.2 PODER DE EXCLUSIÓN

La probabilidad de que un sistema genético específico proporcione evidencias que conduzcan a la exclusión de un sospechoso ^(58,59)

La probabilidad de exclusión a priori es: $PE=pq(1-pq)$

En donde p y q son las frecuencias genéticas de los alelos bajo consideración.

3.12.1.3 PODER DE DISCRIMINACIÓN

Es una medida de la eficiencia de un sistema sobre todo con fines de identificación forense. Se define como la probabilidad de que dos individuos tomados al azar; pertenecientes a la misma población, posean diferentes genotipos.

La fórmula para su cálculo es la siguiente:

$$PD = 1 - \sum_{l=1}^n p^2$$

Donde p_i = son las frecuencias genotípicas esperadas, $\sum p_i^2$ es la probabilidad de coincidencia.

3.12.1.4 PODER DE COINCIDENCIA

Es la probabilidad de que dos individuos tomados al azar de la misma población coincidan en su genotipo para un locus determinado y se calcula a partir de la siguiente formula:

$$PM = 1 - \sum_{l=1}^n p^2$$

Donde p_i = es la frecuencia esperada de cada genotipo ^(58,59)

Como se observa, el poder de discriminación y la probabilidad de coincidencia son conceptos opuestos ($PD=1-PM$)

3.12.1.5 HETEROCIGOSIDAD

La heterocigosidad observada (para un locus) es el número de individuos heterocigotos observados respecto al total analizado, mientras que la heterocigosidad esperada, es la proporción de heterocigotos esperados si la población se encontrara en equilibrio de Hardy-Weinberg.

$$He = \sum_i^m p_i^2$$

3.13 LOCI DE ESTUDIO

El sistema PowerPlex® 21 se utiliza para la identificación humana incluyendo análisis forense de relaciones de parentesco. Este sistema permite amplificar y detectar cuatro marcadores fluorescentes de 21 loci (20 loci STR y la amelogenina) incluidos: D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, Amelogenina, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX y vWA. (cuadro 1)⁽²⁰⁾

Locus	Localización cromosómica	Secuencia repetida
D3S1358	3p21.31 (45.557Mb)	TCTA
D1S1656	1q42(228.972Mb)	TAGA
D6S1043	6q15(92.449Mb)	AGAT
D13S317	13q31.1(81.62Mb)	TATC
Penta E	15q26.2(95.175Mb)	AAAGA
D16S539	16q24.1(84.944Mb)	GATA
D18S51	18q21.33(59.1Mb)	AGAA
D2S1338	2q35(218.705Mb)	TGCC/TTCC
CSF1PO	5q33.1(149.436Mb)	AGAT
Penta D	21q22.3(43.88Mb)	AAAGA
TH01	11p15.5(2.149Mb)	AATG
vWA	12p12(5.963Mb)	TCTA
D21S11	21q21.1(19.476Mb)	TCTA
D7S820	7q21.11(83.433Mb)	GATA
D5S818	5q23.2(123.139Mb)	AGAT
TPOX	2p25.3(1.472Mb)	AATG
D8S1179	8q24.13(125.976)	TCTA
D12S391	12q(12.431Mb)	AGAT/AGAC
D19S433	19q12(35.109Mb)	AAGG
FGA	4q28(155.866Mb)	TTTC

Cuadro 1. Loci de estudio del sistema PowerPlex 21® de Promega®.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso del ADN en apoyo a la investigación del crimen, ha generado el avance más significativo en las ciencias forenses desde la aplicación de las huellas dactilares en el siglo XIX, se ha descrito recientemente como “la herramienta de lucha contra el crimen del siglo XXI” ⁽⁶⁰⁾. Lamentablemente también se han presentado problemas con este sistema de identificación y casos de parentesco, como son las coincidencias fortuitas o las coincidencias aleatorias, que como explica Butler: “es importante darse cuenta que la probabilidad de coincidencia aleatoria no es: la posibilidad de que alguien es culpable o que alguien dejó material biológico en la escena del crimen. Del mismo modo, no es la probabilidad de que el acusado sea inocente o la posibilidad de que alguien tuviera el mismo genotipo, más bien es una probabilidad de coincidencia aleatoria, es simplemente la frecuencia estimada de que un perfil de STRs en particular se produzca en una población. Esta probabilidad de coincidencia aleatoria también se puede considerar como la probabilidad teórica de que la muestra de una persona, al azar de la población, tenga el perfil genético en cuestión” ⁽¹⁰⁾. Esto se debe al elevado número de comparaciones que se realizan y por ende, la posibilidad de que estas coincidencias aumenten. Es por eso que las casas comerciales de materiales de ámbito forense, han desarrollado nuevos paneles que poseen un mayor poder de discriminación, aumentando el número de marcadores genéticos a analizar.

Las frecuencias alélicas de los marcadores nuevos, presentes en el kit PowerPlex® 21 System de Promega®, no se han descrito en la literatura para la población de la ciudad de México, lo que lo hace objeto de comparación con los paneles empleados actualmente como PowerPlex® 16 System o AmpF/STR® Identifiler. En este estudio se determinaremos el nivel de discriminación de estos nuevos marcadores, aunados a los ya utilizados para la población de la Ciudad de México, con el objetivo de demostrar si el panel PowerPlex® 21 tiene un mayor poder de discriminación o no, comparado con los paneles de generaciones pasadas.

En la siguiente imagen se pueden apreciar los cinco nuevos marcadores presentes en el panel PowerPlex® 21System de Promega® y los 16 marcadores que componen a PowerPlex® 16 System y a AmpF/STR® Identifiler: ⁽⁶⁶⁾

LOCUS	PROMEGA		LIFE TECHNOLOGIES [*]
	POWERPLEX [®] 21 SYSTEM	POWERPLEX [®] 16 AND POWERPLEX [®] 16 HS SYSTEM	AMPFSTR [®] IDENTIFILER [®] PCR AMPLIFICATION KIT, IDENTIFILER [®] DIRECT, IDENTIFILER [®] PLUS
Amelogenin	X	X	X
CSF1PO	X	X	X
D12S391	X		
D13S317	X	X	X
D16S539	X	X	X
D18S51	X	X	X
D19S433	X		X
D1S1656	X		
D21S11	X	X	X
D2S1338	X		X
D3S1358	X	X	X
D5S818	X	X	X
D6S1043	X		
D7S820	X	X	X
D8S1179	X	X	X
FGA	X	X	X
Penta D	X	X	
Penta E	X	X	
TH01	X	X	X
TPOX	X	X	X
vWA	X	X	X

Figura 8. Comparación entre PowerPlex[®] 21System de Promega[®], los 16 marcadores que componen a PowerPlex[®] 16 System y los que componen a AmpF/STR[®] Identifiler. Tomado de Promega[®] ⁽⁶⁶⁾

5 OBJETIVOS

- Determinar la frecuencia alélica de 20 loci en una muestra de la población de la Ciudad de México.
- Determinación del poder de discriminación del panelesPowerPlex® 21 System
- Determinar el poder de exclusión del kit PowerPlex® 21 System
- Determinar homocigosidad y heterocigosidad para cada marcador de paneles PowerPlex® 21 System
- Comparar el poder de discriminación el kit PowerPlex® 21 System con los descritos previamente en la misma población.

6 HIPÓTESIS

Se espera que este nuevo panel PowerPlex® 21 System tenga un mayor poder de discriminación comparado con paneles anteriores que tienen un menor número de marcadores en su análisis. Se espera que la distribución de las frecuencias de los 20 marcadores genéticos analizados, estén dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg y que el nivel de heterocigosidad del panel sea superior al 60%.

7 MATERIAL Y MÉTODO

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio experimental, prospectivo, transversal y comparativo.

7.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

En el presente estudio se analizaron 200 muestras de sangre en papel FTA, provenientes de mujeres y varones tomados al azar pertenecientes a la población de la Ciudad de México, obtenidas de casos rutinarios de paternidad (padres y madres) del Centro de Estudios e Investigaciones ANIGEN y de los donantes anónimos a través de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M. Estas últimas debían cumplir con la condición de que no coincidiesen los apellidos de los donantes para obviar posibles relaciones de parentesco.

Cada uno de los donantes dio su consentimiento no firmado para la participación del estudio, con la premisa de mantener su identidad anónima. La identidad se mantendrá oculta ya que para el estudio no será necesario su empleo.

Universo de trabajo: la población de estudio está formada por la población de la Ciudad de México cuyo tamaño de muestra se basó en la cantidad necesaria para poder determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg según sus requerimientos estadísticos.

Las características de la muestra son: Igual proporción de hombres y mujeres.

- Las generaciones no se sobreponen
- Son organismos diploides.
- Su reproducción es sexual.
- Apareamientos al azar (panmixia).
- No hay mutación
- La población es grande

- No hay migración
- No hay selección

7.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

7.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material de análisis es sangre total fijada en papel FTA™ de 200 personas.

7.3.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Personas pertenecientes a la población de la ciudad de México, sin límite de edad.

7.3.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Personas consanguíneas

7.3.1.3 CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Muestras contaminadas

7.3.1.4 VARIABLES

INDEPENDIENTE:

- El genotipo de cada individuo de la muestra poblacional.

DEPENDIENTES:

- Las frecuencias alélicas.
- Índice de heterocigosidad y homocigosidad.
- Poder de discriminación del panel.
- Poder de exclusión del panel
- Contenido de índice polimórfico

7.3.2 EQUIPO

- Analizador automático de biología molecular 3100-Avant de AppliedBiosystem.
- Termociclador GENEAMP® SYSTEM 9700.
- Campana de flujo laminar.
- MicropipetaEppendorf de 100µL.
- MicropipetaEppendorf de 1000µL.
- Vortex, Sarstedt.
- Puntas para pipeta de 100µL.
- Puntas para pipeta de 1000µL.
- Harris Micro-Punch para papel FTA
- Guantes de nitrilo.
- Tubos eppendorf de 1.5mL.
- Placa de 96 pozos
- Lancetas
- Papel FTA
- Torundas
- PowerPlex® 21 System
- Hi-Di™ formamide
- Pop 4
- Amortiguador de elusión
- Cubrebocas
- Micropipeta multicanal Eppendorf

- Marcador indeleble
- Congelador Revco -86°C
- Refrigerador Revco -4°C
- Alcohol etílico al 70%
- Encendedor
- Tapas de goma, para charola de 96 pozos. (septa)
- Tapas para charola de amplificación

7.4 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Rotular el material que se utilizará, de lo contrario puede haber errores con las muestras.

1. Limpieza del área que se punciona para obtención de sangre con una torunda con alcohol al 70%.
2. Punción con una lanceta
3. Cuando la sangre comience a fluir se debe acercar la tarjeta de FTA.
4. Dejar que se sequen las tarjetas de FTA.

7.5 AMPLIFICACIÓN

El panel que se utilizó es PowerPlex® 21 System de la casa comercial Promega, sus componentes son:

- PowerPlex® 21 5X Master Mix
- PowerPlex® 21 5X primer PairMix
- Agua grado de amplificación

Nota: el panel se mantuvo en congelación hasta el momento de su uso. En el momento que se utilizó; se mezcló cada tubo en un vortex por aproximadamente 15 segundos.

1. Se determinó el número de reacciones incluyendo el control positivo y negativo, se consideró dos reacciones más para la compensación del pipeteo.
2. En un tubo se preparó la mezcla de reacción según las cantidades siguientes.

Componentes de la reacción	Volumen para una sola reacción	X	Número de reacciones	=	Volumen final
Agua, grado de amplificación	15µL	X		=	
PowerPlex® 21 5X Mezcla Maestra	5.0 µL	X		=	
PowerPlex® 21 5X Mezcla de pares de primers	5.0 µL	X		=	
Volumen total	25 µL	X		=	

3. La mezcla de reacción se preparó en 2 tubos de 1.5 mL debido al volumen de la mezcla.

Previamente a realizar la mezcla los reactivos se deben agitar.

4. La mezcla se adicionó a una placa de 96 pozos, sin embargo, seis pozos se dejaron vacíos, esto debido a que más adelante se requerirá ese espacio.
5. Se colocará un disco de papel FTA, previamente cortado con el perforador Mini-Punch Harris.
6. Nota. Cada que se corte un disco con el perforador Mini-Punch Harris, se debe limpiar con una torunda con alcohol y colocado a la flama de un encendedor, para evitar la contaminación con otras muestras.
7. Se llenó la placa; columna por columna en orden creciente y dejando al final ambos controles. Al finalizar cada columna, se tapó para evitar contaminación.

7.5.1 Condiciones de amplificación de los sistemas

Los programas de amplificación se llevan a cabo en un termociclador GENEAMP® SYSTEM 9700 con el siguiente protocolo:

Se incuban las muestras a 96°C durante 1 minuto (desnaturalización del ADN), después a 94°C durante 10 segundos, 59°C un minuto (fase de alineación), finalmente la extensión será a 72°C por 30 segundos. Durante 25 ciclos. Con un ciclo final de 20 minutos a 60°C.

Una vez finalizado el proceso las muestras se conservaron a 4°C hasta su uso.

7.6 ELECTROFORESIS CAPILAR

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Nota. El panel se mantuvo en congelación hasta su uso. Antes de su empleo cada reactivo se agitó en un vortex por aproximadamente 15 segundos.

1. Se preparó una Master Mix combinando la cantidad necesaria de Hi-Di™formamide y CC5 Internal Line Standard 500 como se menciona a continuación:

$$[(2.0\mu\text{l CC5 ILS 500}) \times (\# \text{muestras})] + [(20.0\mu\text{l Hi-Di}^{\text{TM}} \text{ formamide}) \times (\# \text{muestras})]$$

2. Se agitó la mezcla de reacción durante 15 segundos.
3. Se colocó en una placa de 96 pozos del GeneticAnalyzer 20μL de la mezcla maestra en cada uno de los pozos.
4. Se agregó 1.5 μL de cada producto de PCR en el pozo correspondiente.
5. Se agregó 1μl of PowerPlex® 21 AllelicLadderMix en cada uno de los pozos destinados para este.

Nota. Para la placa de 96 pozos se utilizaron seis pozos con PowerPlex® 21 AllelicLadderMix, 88 para las muestras y las 2 restantes para los controles positivo y negativo.

6. Sellar la placa con una septa.
7. Llenar el registro de una nueva placa y comenzar la corrida.

El secuenciador automático de ADN consta de una unidad de electroforesis y un sistema de detección fluorescente asociado a un ordenador, lo que permite controlar el proceso electroforético, así como el almacenamiento de datos y su posterior análisis.

El corrimiento electroforético se realizó bajo las condiciones establecidas por el proveedor:

- Voltaje de inyección 3 kV
- Tiempo de inyección 5 segundos
- Tiempo de corrimiento electroforético 1500 segundos

El perfil genético se obtuvo con ayuda del software GeneMapper ID V.3.2

8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El principio de equilibrio de Hardy-Weinberg utiliza formulas matemáticas para expresar la probabilidad de que en apareamientos al azar nazcan individuos de cada uno de los fenotipos, a saber: homocigotos para un alelo; heterocigotos; homocigotos para el otro alelo.

Para comprobar que la población está en equilibrio se calcularon los siguientes datos:

Frecuencias alélicas, Frecuencias fenotípicas observadas, Frecuencias fenotípicas esperadas, Número de individuos esperado y prueba de X^2 .

Los grados de libertad se calcularon con el número total de fenotipos menos el número de alelos. Se fija un valor de α (alfa) de 0.05 para aceptar la hipótesis de equilibrio. El valor obtenido con los resultados de la prueba X^2 se comparó con el que aparece en las tablas; para aceptar que hay equilibrio, el resultado obtenido debe ser menor que el tabulado.

Poder de exclusión.

Se define como la probabilidad de que un sistema genético específico, de evidencias que conduzcan a la exclusión de un sospechoso ^(58, 59)

En los sistemas genéticos codominantes de dos alelos, la probabilidad de exclusión a priori (P_e) es:

$$P_e = pq(1-pq)$$

Poder de discriminación.

Es la probabilidad de que dos individuos tomados al azar puedan ser diferenciados genéticamente mediante el análisis de un marcador o conjunto de marcadores genéticos.

$$PD = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia esperada de cada genotipo ^(58,59)

Heterocigosidad.

Representa una mejor medida de la variación genética, ya que es precisa y no arbitraria. La heterocigosidad la podemos estudiar como HO y HE.

La H_o se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los loci y se calcula por cómputo directo. Mientras que la H_e , desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes. En una población en equilibrio H-W, la frecuencia de los heterocigotos viene dada por la ecuación $2pq$.

La heterocigosidad observada (para un locus) es el número de individuos heterocigotos observados respecto al total analizado, mientras que la heterocigosidad esperada, es la proporción de heterocigotos esperados si la población se encontrara en equilibrio de Hardy-Weinberg.

$$H_e = \sum_i^m p_i^2$$

Siendo P_i la frecuencia génica del alelo i , en un locus de m alelos.

El PIC es similar al valor de heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la probabilidad que sea informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^{n-1} 2p_i^2 p_j^2$$

9 RESULTADOS

9.1 RESULTADOS DE LA MUESTRA POBLACIONAL

9.1.1 POBLACIÓN

Se llevó a cabo el análisis genético poblacional de 200 individuos no emparentados mediante el estudio de los marcadores: D3S1358, D1S1656, D6S1043, D13S317, Penta E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, Penta D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433 y FGA.

9.1.2 OTROS PARÁMETROS

Además de la obtención de las frecuencias alélicas se calcularon otros parámetros estadísticos de aplicación forense: PIC, heterocigosidad, homocigosidad, poder de exclusión y poder de discriminación; mostrados en la tabla 24.

9.1.3 EQUILIBRIO GENÉTICO

La prueba exacta del equilibrio genético se calculó mediante la prueba paramétrica de X^2 que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica. Cuadro 23.

9.1.4 ELECTROFORESIS CAPILAR

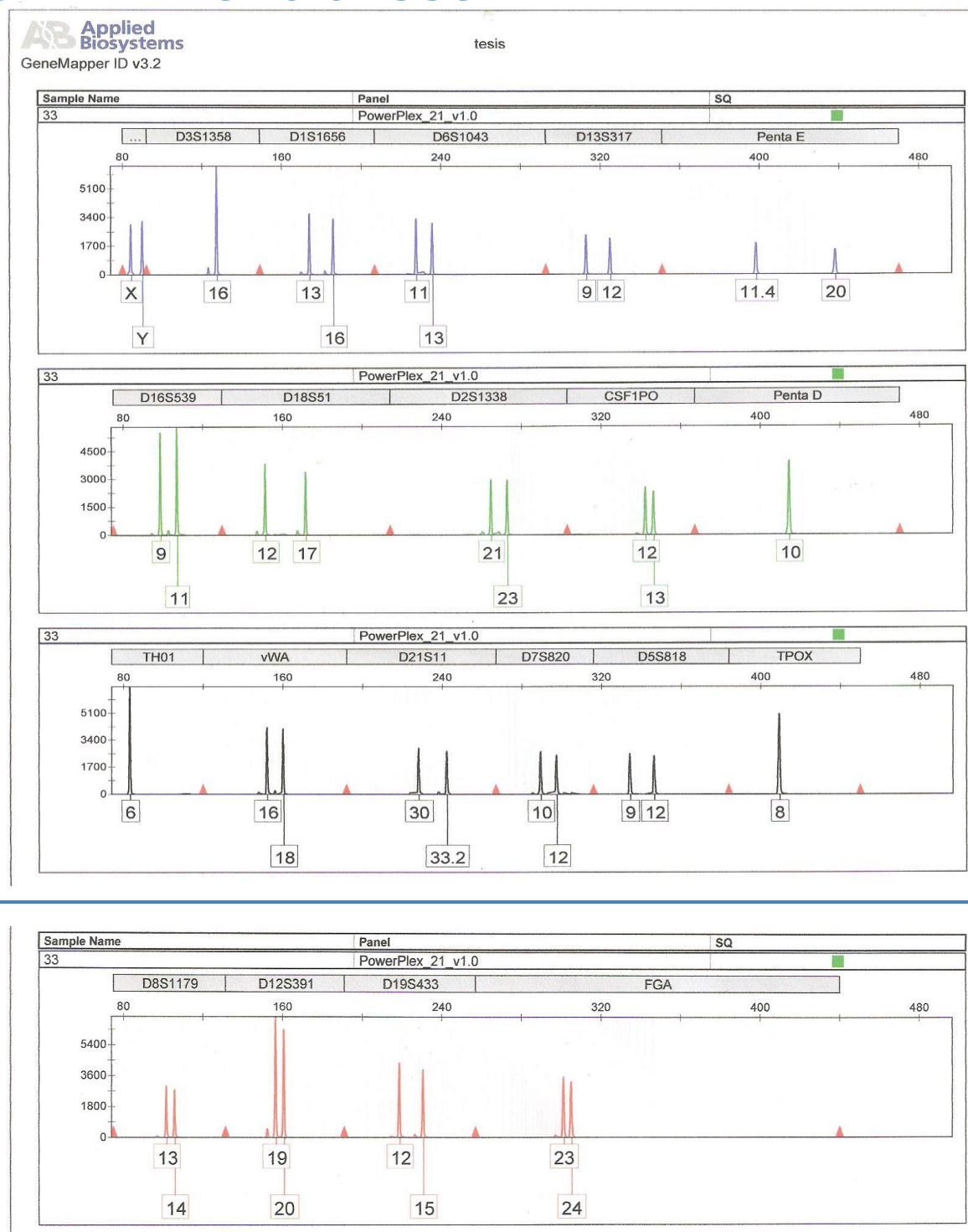


Figura 9. Electroferograma de la muestra 33, ejemplo representativo para las 200 muestras analizadas, en el estudio de la población de la Ciudad de México.

9.1.5 FRECUENCIAS ALÉLICAS

Una vez obtenido el perfil genético de cada individuo mediante el software GeneMapper y se determinaron las frecuencias alélicas de la muestra de la población.

A continuación se presentan las tablas y gráficos de barras para cada uno de los loci, que se analizaron en este trabajo. Los cuadros muestran en su primer columna, los alelos que se encontraron en ese locus para la muestra poblacional de la Ciudad de México; la segunda columna (n), muestra el número de veces que se encontró el alelo para la muestra poblacional y en la tercer columna se observa la frecuencia de cada alelo en ese marcador para la muestra de la población de la Ciudad de México. En los gráficos de barras se puede apreciar la frecuencia de cada alelo, del respectivo locus, para la muestra poblacional de la Ciudad de México.

9.1.5.1 Locus D3S1358

Para el marcador D3S1358, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los tres alelos de mayor frecuencia son 15 y 16, contrarios a los alelos 13, 19 y 15.2, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 2 y Figura 9)

Frecuencias alélicas para locus D3S1358		
Alelo	n	Frecuencia
13	4	0.01
14	26	0.065
15	182	0.455
15.2	1	0.0025
16	116	0.29
17	53	0.1325
18	16	0.04
19	2	0.005

Cuadro 2. Frecuencias Alélicas para el locus D3S1358 en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

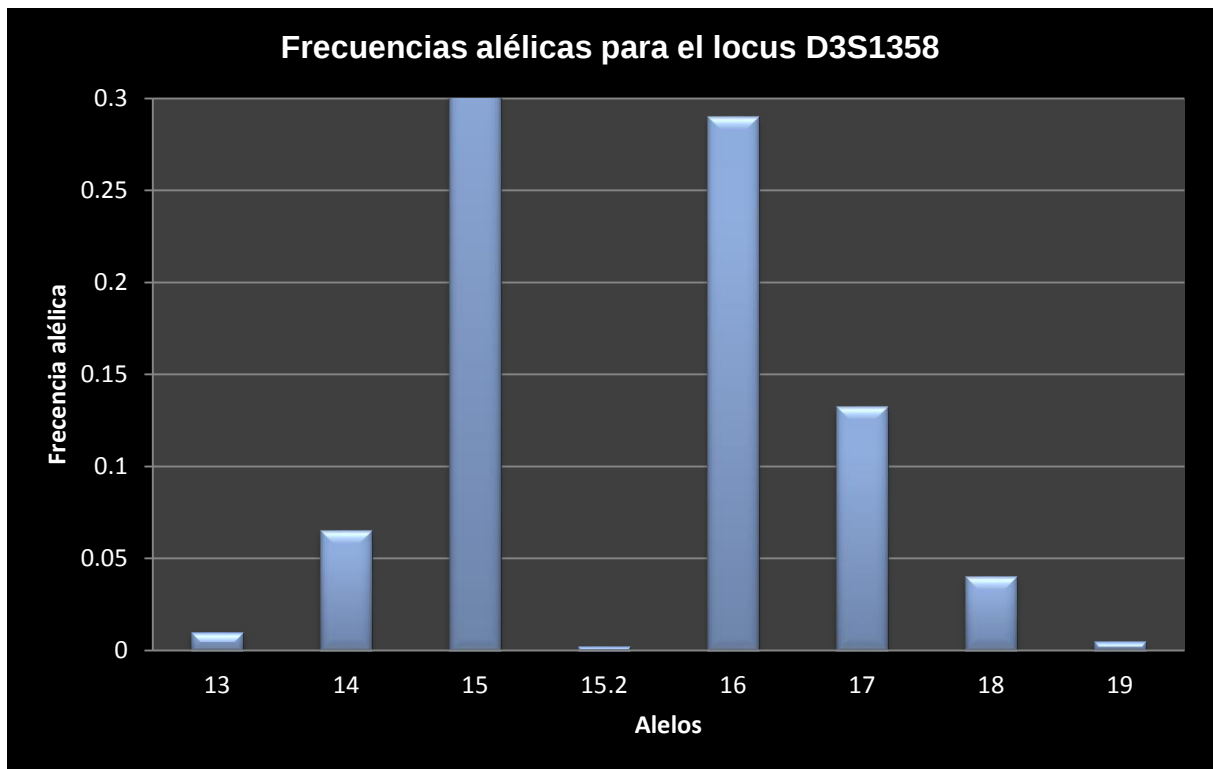


Figura 9. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D3S1358 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.2 Locus D1S11656

Para el marcador D1S11656, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los dos alelos de mayor frecuencia son 16 y 17.3, contrarios a los alelos 14.3, 18, 25 y 25.3, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 3 y Figura 10)

Frecuencias alélicas para locus D1S11656		
Alelo	n	Frecuencia
11	13	0.0325
12	26	0.065
13	37	0.0925
14	48	0.12
14.3	1	0.0025
15	57	0.1425
15.3	11	0.0275
16	85	0.2125
16.3	16	0.04
17	25	0.0625
17.3	60	0.15
18	1	0.0025
18.3	16	0.04
19.3	2	0.005
25	1	0.0025
25.3	1	0.0025

Cuadro 3. Frecuencias Alélicas para el locus D1S11656 en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

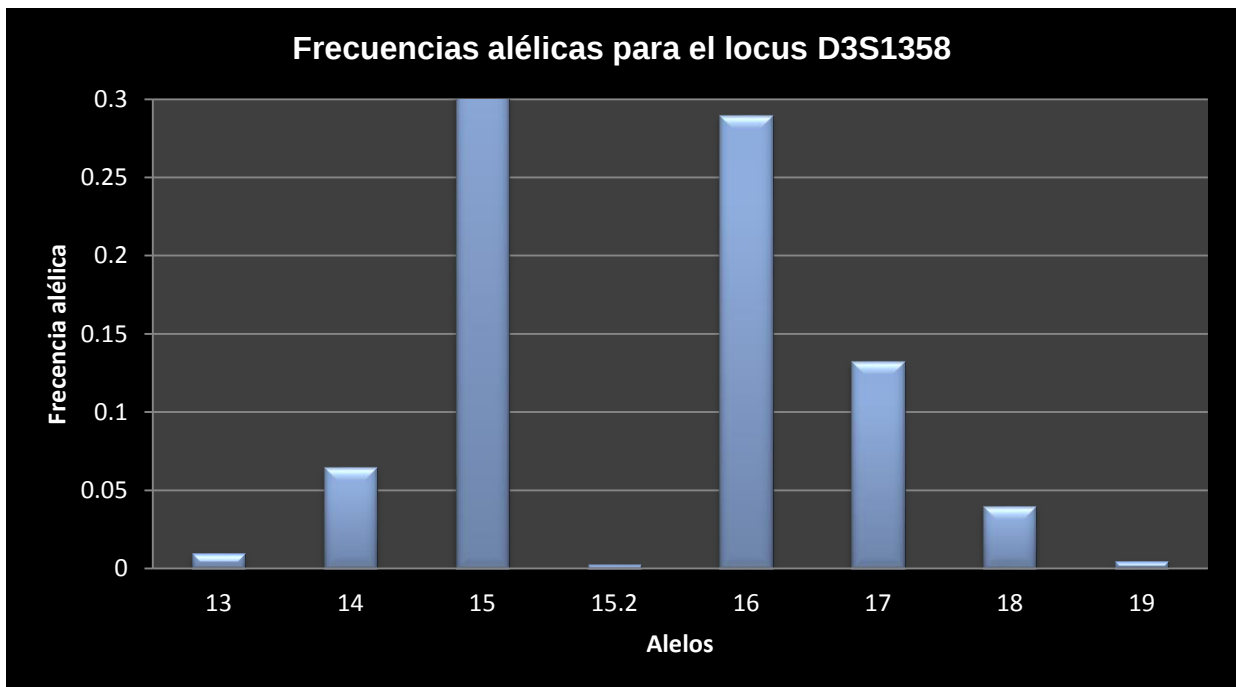


Figura 10. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D1S11656 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.3 Locus D6S1043

Para el marcador D6S1043, se encontró que en la muestra de la poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia fue el 14, contrario a los alelos 23.2 y 23.3, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 4 y Figura 11)

Frecuencias alélicas para locus D6S1043		
Alelo	n	Frecuencia
10	3	0.0075
11	43	0.1075
12	57	0.1425
13	40	0.1
14	100	0.25
15	16	0.04
16	5	0.0125
17	10	0.025
18	24	0.06
19	28	0.07
19.3	2	0.005
20	7	0.0175
20.3	11	0.0275
21.3	37	0.0925
22.3	15	0.0375
23.2	1	0.0025
23.3	1	0.0025

Cuadro 4. Frecuencias Alélicas para el locus D6S1043 en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

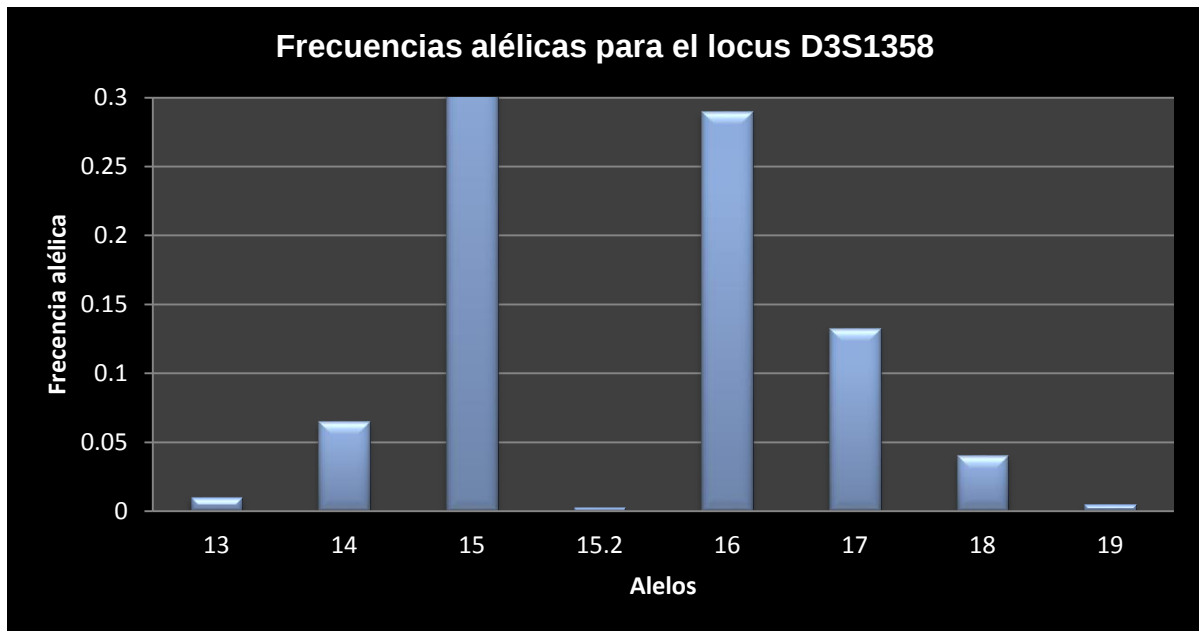


Figura 11. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D6S1043 de la muestra poblacional de la Ciudad de México.

9.1.5.4 Locus D13S317

Para el marcador D13S317, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los alelos de mayor frecuencia son el 9 y 12, contrario a los alelos 8 y 14, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 5 y Figura 12)

Frecuencias alélicas para locus D13S317		
Alelo	n	Frecuencia
8	29	0.0725
9	97	0.2425
10	46	0.115
11	68	0.17
12	82	0.205
13	50	0.125
14	28	0.07

Cuadro 5. Frecuencias Alélicas para el locus D13S317, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

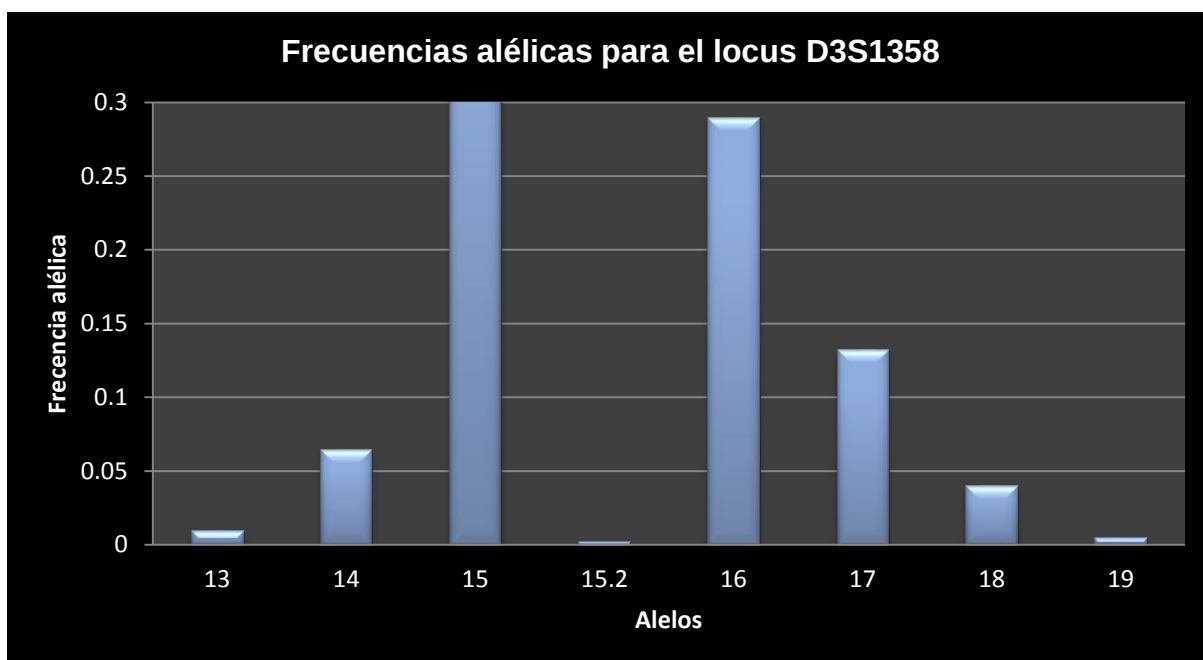


Figura 12. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D13S317 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.5 Locus Penta E

Para el marcador Penta E, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los alelos de mayor frecuencia son el 12 y 15, contrario a los alelos 11.4, 12.1 y 24, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 6 y Figura 13)

Frecuencias alélicas para locus Penta E		
Alelo	n	Frecuencia
5	13	0.0325
7	22	0.055
8	11	0.0275
9	2	0.005
10	15	0.0375
11	18	0.045
11.4	1	0.0025
12	61	0.1525
12.1	1	0.0025
13	23	0.0575
14	39	0.0975
15	50	0.125
16	41	0.1025
17	41	0.1025
18	10	0.025
19	14	0.035
20	17	0.0425
21	10	0.025
22	8	0.02
23	2	0.005
24	1	0.0025

Cuadro 6. Frecuencias Alélicas para el locus Penta E, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

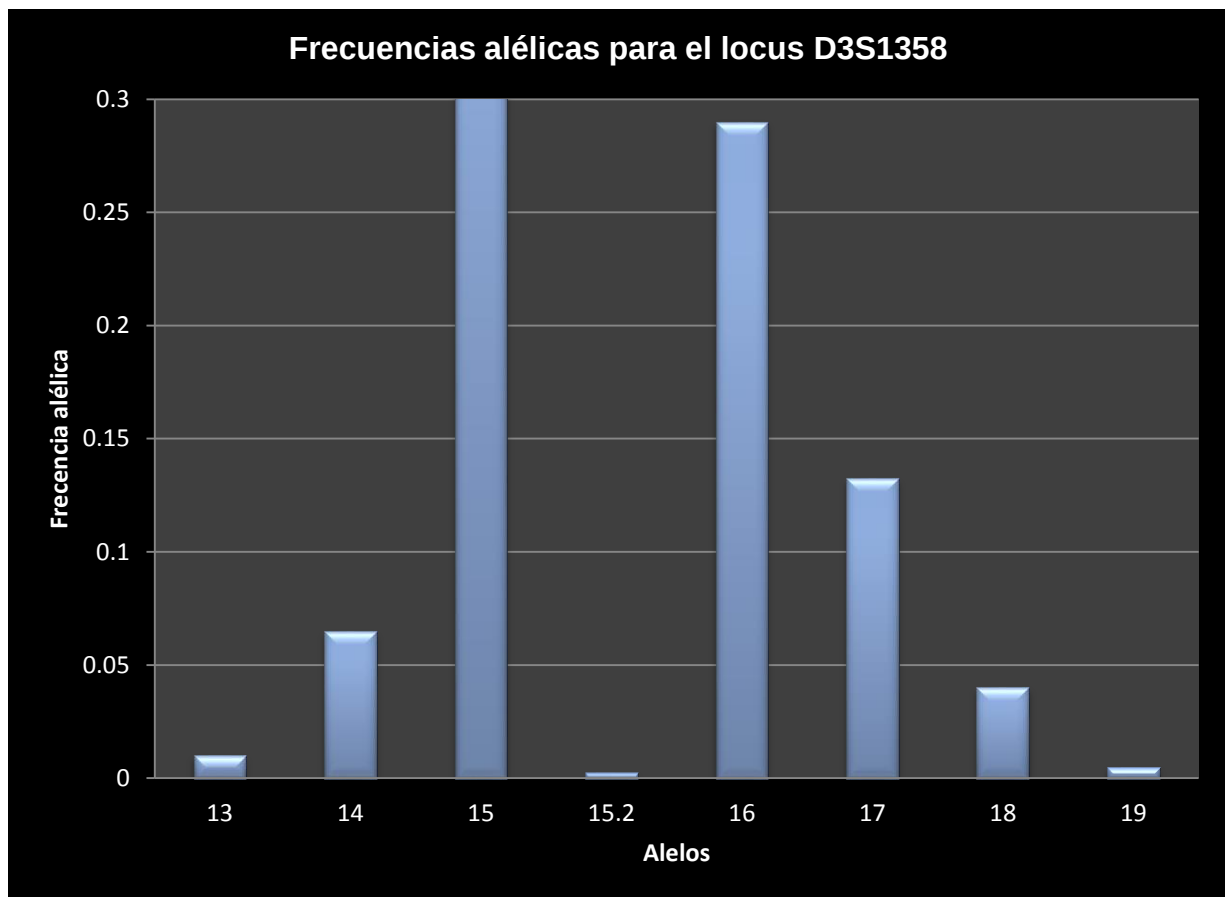


Figura 13. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus Penta E de la muestra poblacional de la Ciudad de México.

9.1.5.6 Locus D16S539

Para el marcador D16S539, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los alelos de mayor frecuencia son el 11 y 12, contrario a los alelos 8, 14 y 15, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 7 y Figura 14)

Frecuencias alélicas para locus D16S539		
Alelo	n	Frecuencia
8	4	0.01
9	42	0.105
10	81	0.2025
11	112	0.28
12	111	0.2775
13	45	0.1125
14	4	0.01
15	1	0.0025

Cuadro 7. Frecuencias Alélicas para el locus D16S539, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

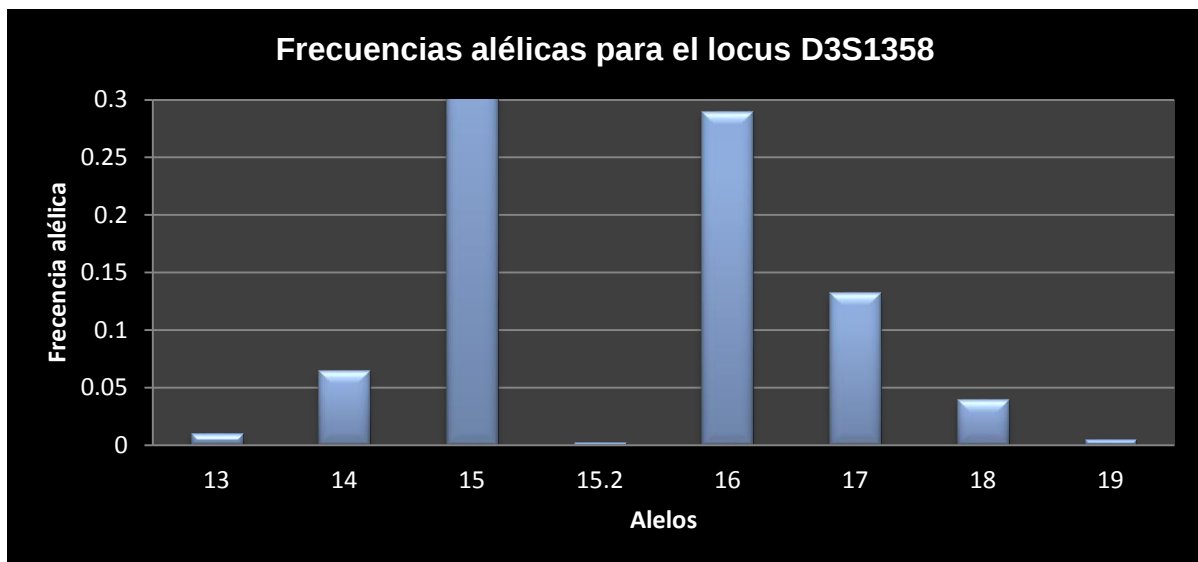


Figura 14. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D16S539 de la muestra poblacional de la Ciudad de México.

9.1.5.7 Locus D18S51

Para el marcador D18S51, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México los alelos de mayor frecuencia son el 17 y 14, contrario a los alelos 11, 24 y 25, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 8 y Figura 15)

Frecuencias alélicas para locus D18S51		
Alelo	n	Frecuencia
11	1	0.0025
12	52	0.13
13	42	0.105
14	69	0.1725
15	67	0.1675
16	42	0.105
17	73	0.1825
18	20	0.05
19	11	0.0275
20	6	0.015
21	8	0.02
22	5	0.0125
23	2	0.005
24	1	0.0025
25	1	0.0025

Cuadro 8. Frecuencias Alélicas para el locusD18S51, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

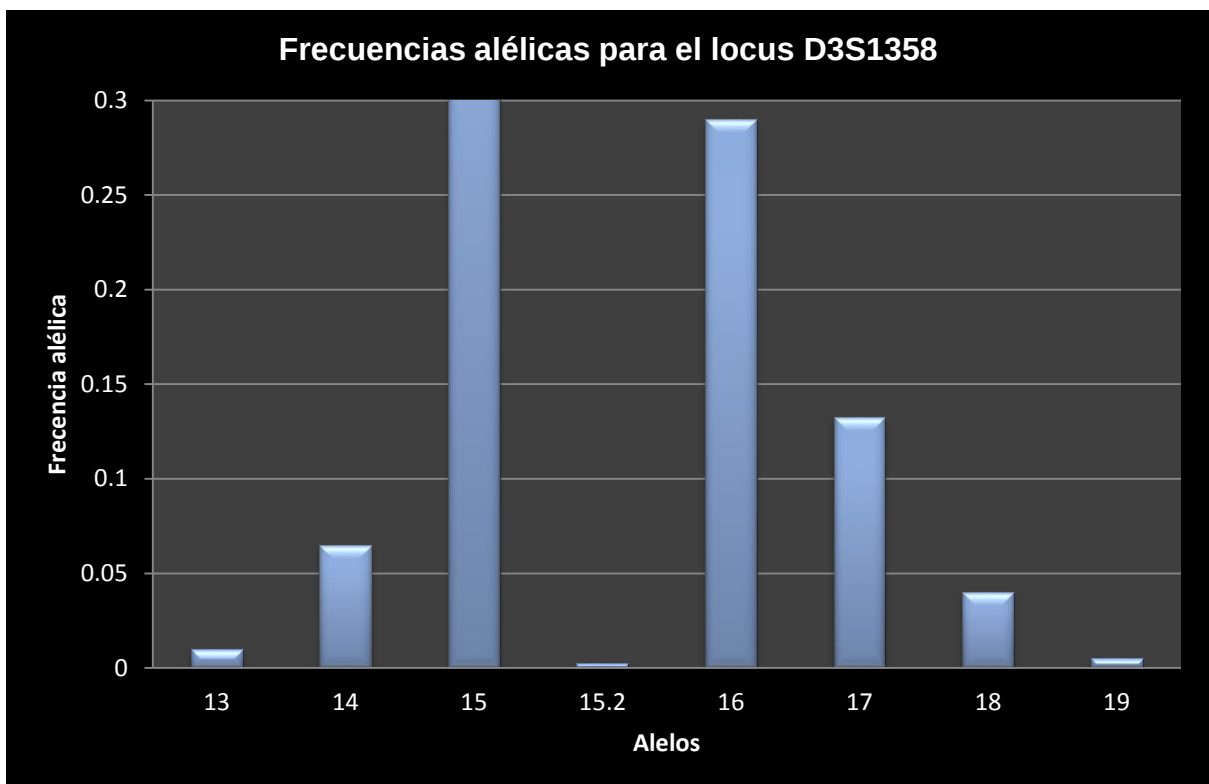


Figura 15. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locusD18S51 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.8 Locus D2S1338

Para el marcador D2S1338, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los tres alelos de mayor frecuencia son 19, 23 y 17, contrarios a los alelos 27 y 26 que son los de menor frecuencia. (Cuadro 9 y Figura 16)

Frecuencias alélicas para locus D2S1338		
Alelo	n	Frecuencia
16	10	0.025
17	71	0.1775
18	17	0.0425
19	91	0.2275
20	50	0.125
21	15	0.0375
22	32	0.08
23	82	0.205
24	14	0.035
25	12	0.03
26	4	0.01
27	2	0.005

Cuadro 9. Frecuencias Alélicas para el locus D2S1338, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

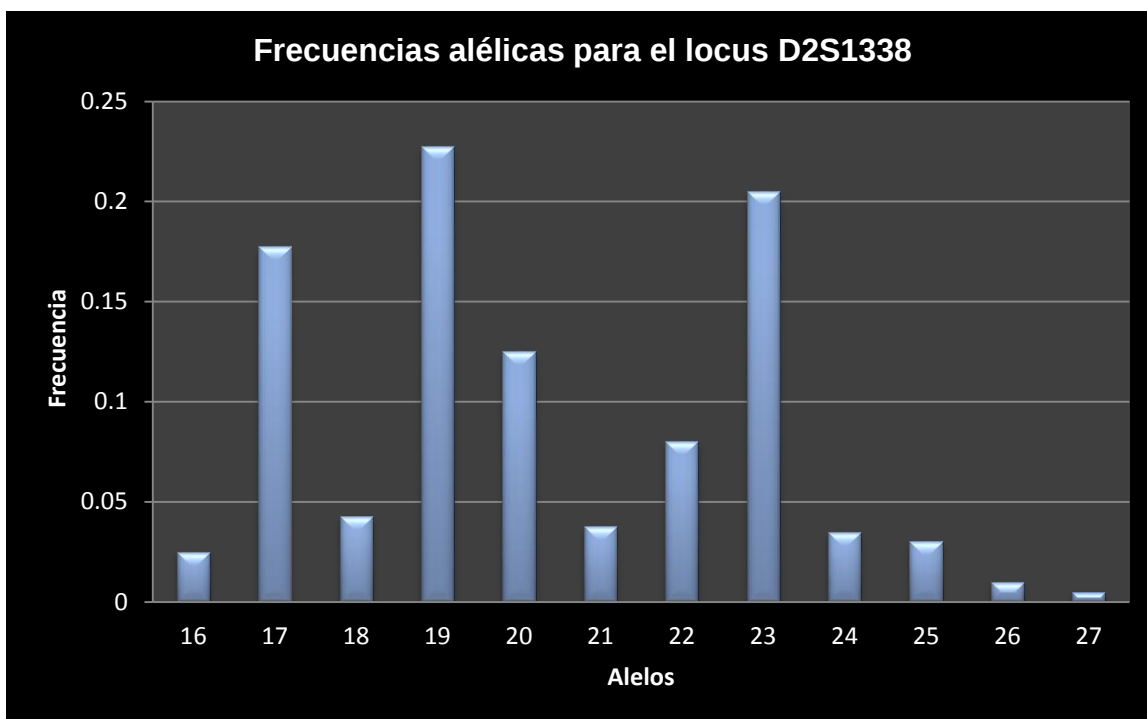


Figura 16. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D2S1338 de la muestra poblacional de la Ciudad de México.

9.1.5.9 Locus CSF1PO

Para el marcador CSF1PO, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los alelos de mayor frecuencia son 12, 11 y 10, contrarios a los alelos 8 y 14 que son los de menor frecuencia. (Cuadro 10 y Figura 17)

Frecuencias alélicas para locus CSF1PO		
Alelo	n	Frecuencia
8	2	0.005
9	7	0.0175
10	99	0.2475
11	112	0.28
12	155	0.3875
13	23	0.0575
14	2	0.005

Cuadro 10. Frecuencias Alélicas para el locus CSF1PO, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

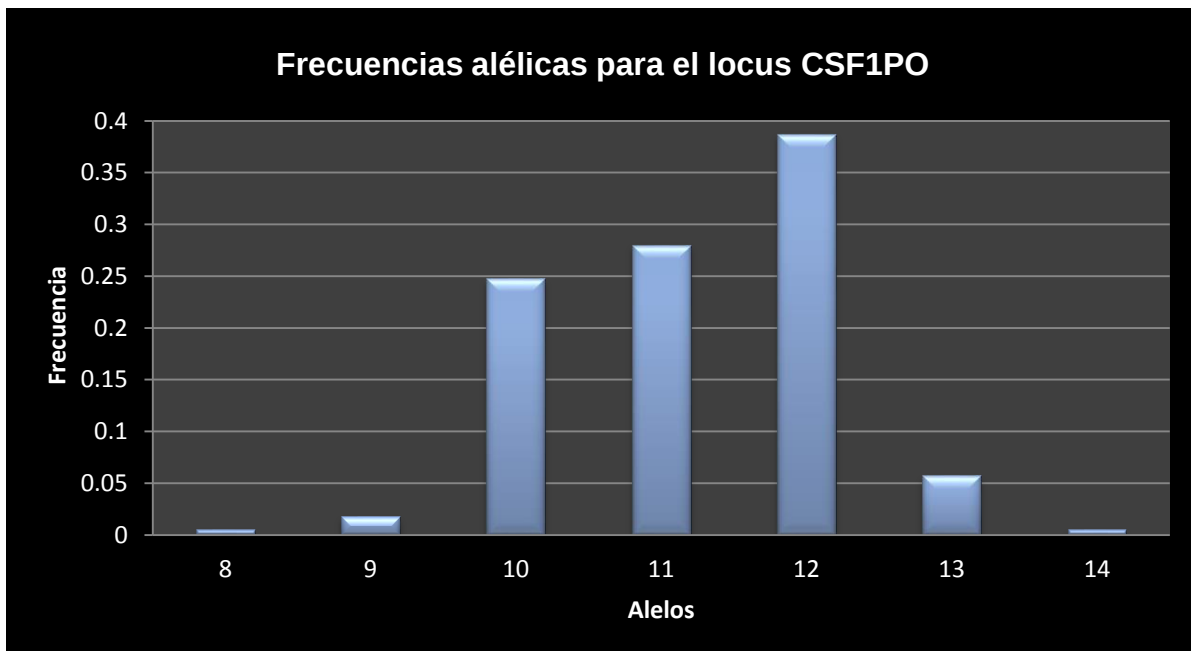


Figura 17. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus CSF1PO de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.10 Locus Penta D

Para el marcador Penta D, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los tres alelos de mayor frecuencia son 10, 9 y 12, contrarios a los alelos 15 y 5 que son los de menor frecuencia. (Cuadro 11 y Figura 18).

Frecuencias alélicas para locus Penta D		
Alelo	n	Frecuencia
2.2	4	0.01
5	2	0.005
7	3	0.0075
8	4	0.01
9	79	0.1975
10	97	0.2425
11	51	0.1275
12	73	0.1825
13	66	0.165
14	20	0.05
15	1	0.0025

Cuadro 11. Frecuencias Alélicas para el locus Penta D, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

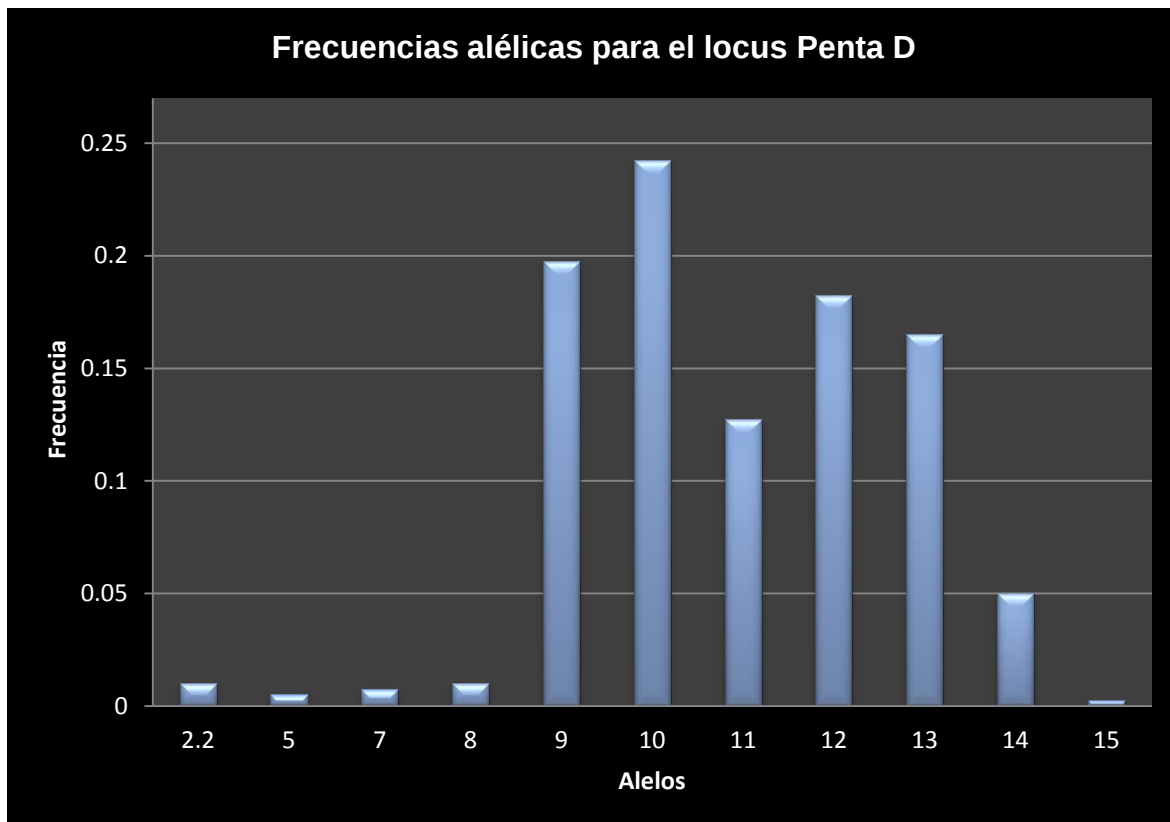


Figura 18. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus Penta D de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.11 Locus TH01

Para el marcador TH01, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia es el 7, contrario a los alelos 1 y 2 que son los de menor frecuencia. (Cuadro 12 y Figura 19).

Frecuencias alélicas para locus TH01		
Alelo	n	Frecuencia
6	123	0.3075
7	145	0.3625
8	20	0.05
8.3	1	0.0025
9	24	0.06
9.3	85	0.2125
10	2	0.005

Cuadro 12. Frecuencias Alélicas para el locus TH01, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

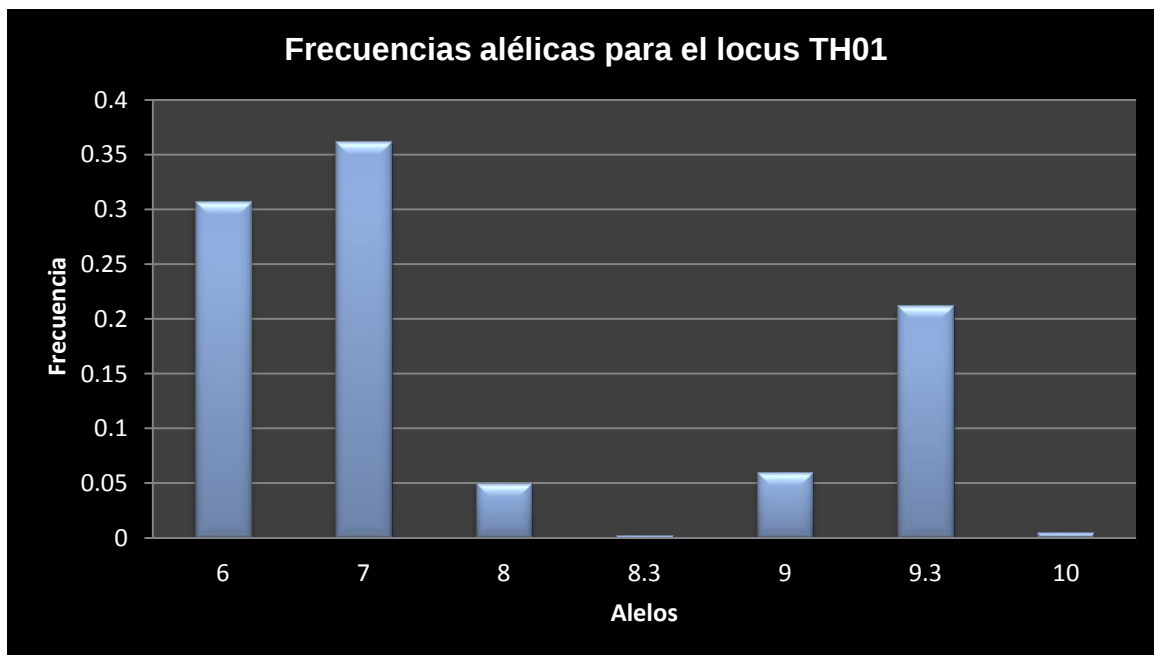


Figura 19. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus TH01 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.12 Locus vWA

Para el marcador vWA, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los alelos de mayor frecuencia son 16 y 17, contrarios al alelo 20 que es el de menor frecuencia. (Cuadro 13 y Figura 20).

Frecuencias alélicas para locus vWA		
Alelo	n	Frecuencia %
14	21	0.0525
15	25	0.0625
16	155	0.3875
17	116	0.29
18	67	0.1675
19	15	0.0375
20	1	0.0025

Cuadro 13. Frecuencias Alélicas para el locus vWA, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

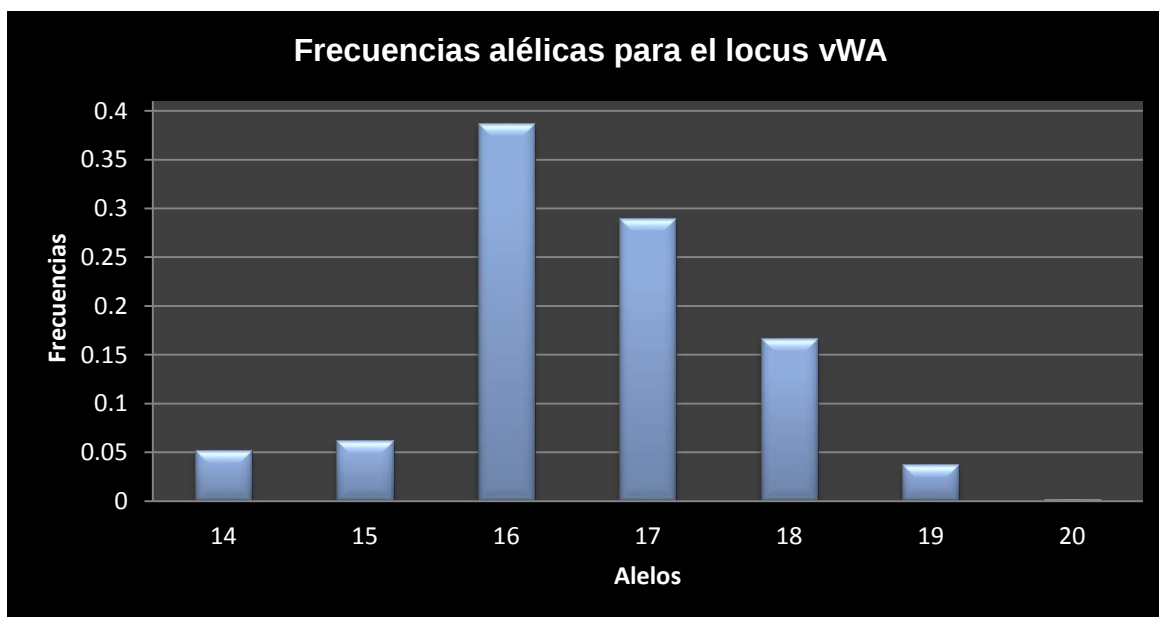


Figura 20. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus vWA de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.13 Locus D21S11

Para el marcador D21S11, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México el alelo de mayor frecuencia es el 30, contrario a los alelos 33.1, 29.2 y 34.2 que son los de menor frecuencia. (Cuadro 14 y Figura 21).

Frecuencias alélicas para locus D21S11		
Alelo	n	Frecuencia
27	3	0.0075
28	36	0.09
29	69	0.1725
29.2	2	0.005
30	119	0.2975
30.2	4	0.01
31	26	0.065
31.2	49	0.1225
32	10	0.025
32.2	55	0.1375
33.1	1	0.0025
33.2	24	0.06
34.2	2	0.005

Cuadro 14. Frecuencias Alélicas para el locus D21S11, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

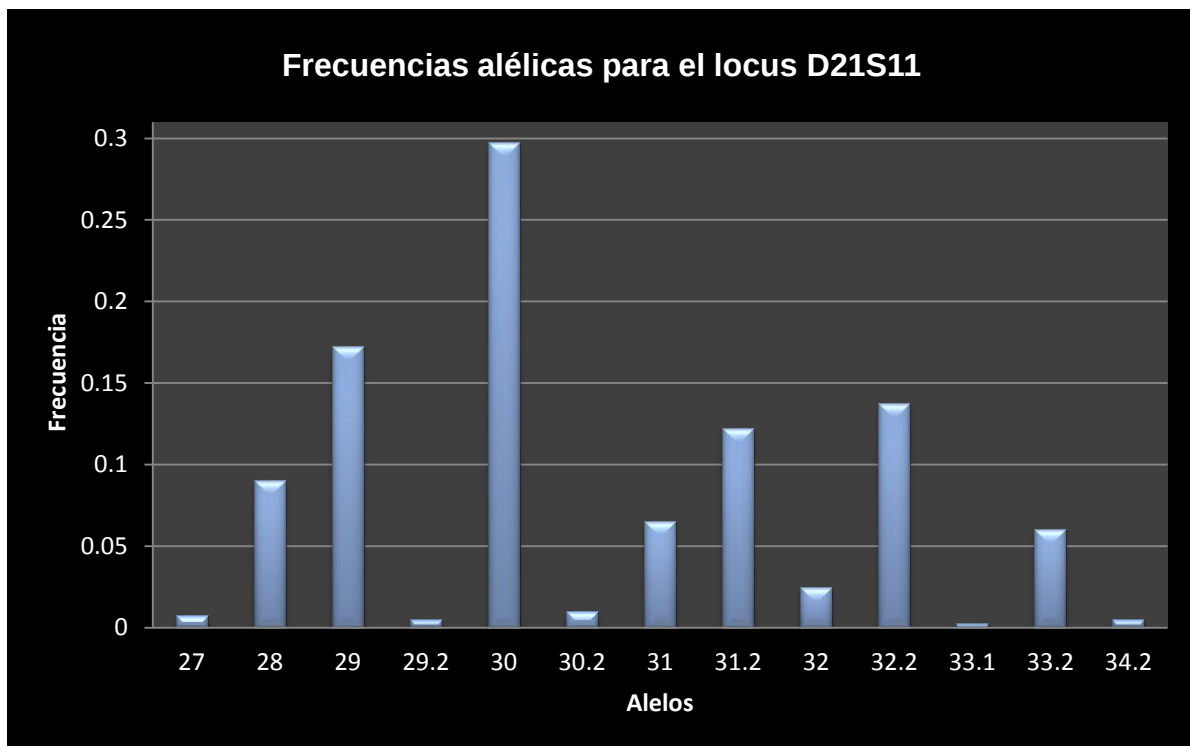


Figura 21. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D21S11 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.14 Locus D7S820

Para el marcador D7S820, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los tres alelos de mayor frecuencia son 11, 10 y 12, contrarios a los alelos 14 y 7 que son los de menor frecuencia. (Cuadro 15 y Figura 22).

Frecuencias alélicas para locus D7S820		
Alelos	n	Frecuencia
7	2	0.005
8	41	0.1025
9	14	0.035
10	107	0.2675
11	126	0.315
12	90	0.225
13	19	0.0475
14	1	0.0025

Cuadro 15. Frecuencias Alélicas para el locus D7S820, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

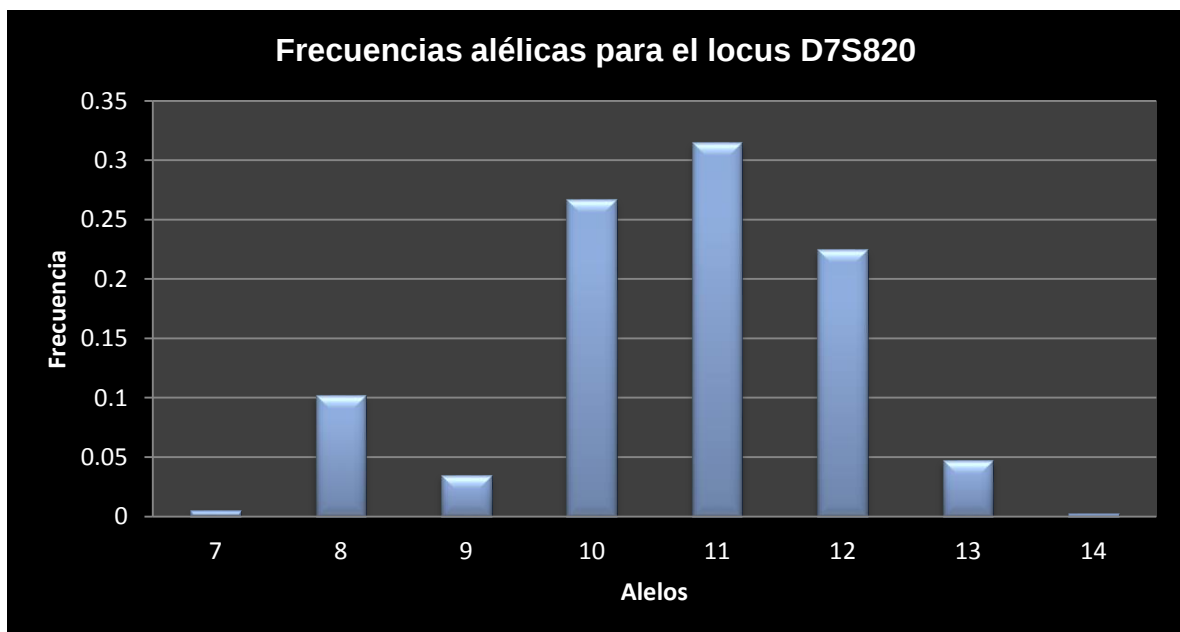


Figura 22. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locusD7S820 de la Ciudad de México

9.1.5.15 Locus D5S818

Para el marcador D5S818, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, los alelos de mayor frecuencia son 11 y 12, contrarios al alelo 14 que es el de menor frecuencia. (Cuadro 16 y Figura 23).

Frecuencias alélicas para locus D5S818		
Alelos	n	Frecuencia %
7	26	0.065
9	22	0.055
10	14	0.035
11	201	0.5025
12	104	0.26
13	32	0.08
14	1	0.0025

Cuadro 16. Frecuencias Alélicas para el locus D5S818, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

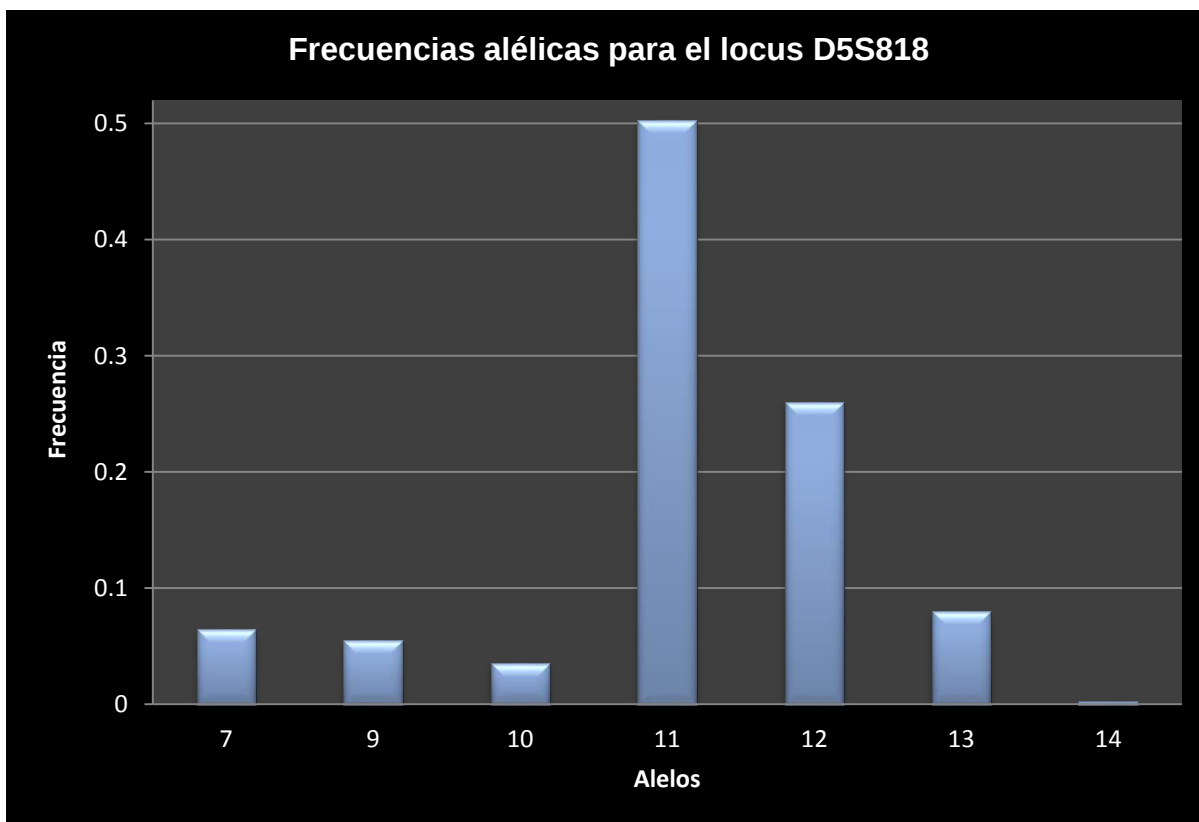


Figura 23. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D5S818 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.16 Locus TPOX

Para el marcador TPOX, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia es el 8, contrario a los alelos 10 y 9, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 17 y Figura 24).

Frecuencias alélicas para locus TPOX		
Alelos	n	Frecuencia
8	214	0.535
9	22	0.055
10	11	0.0275
11	99	0.2475
12	54	0.135

Cuadro 17. Frecuencias Alélicas para el locus TPOX, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

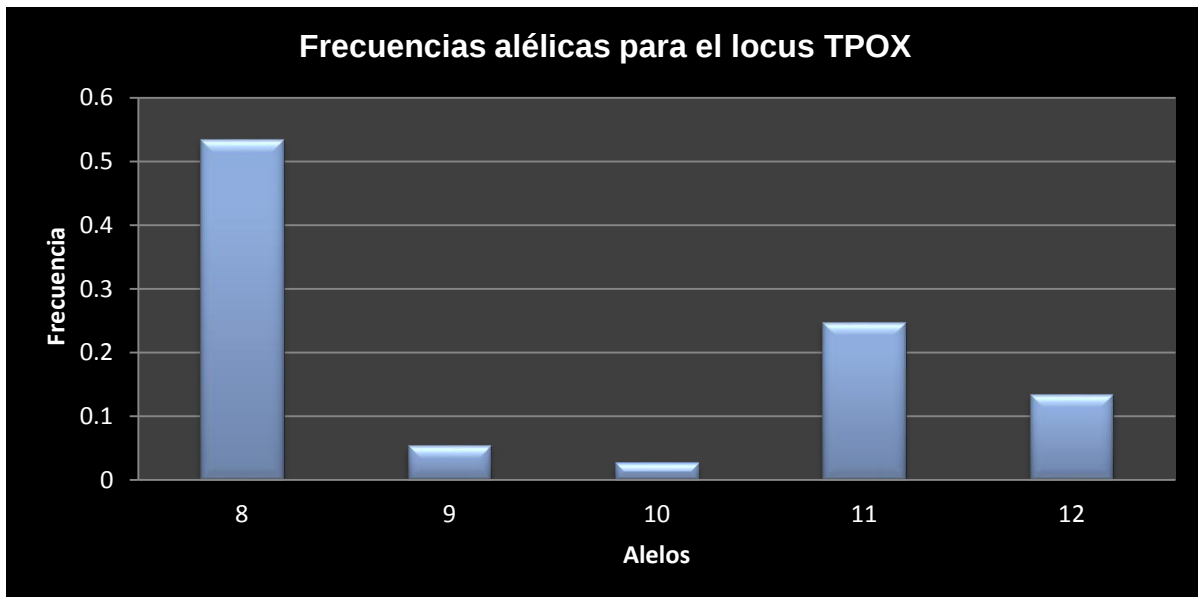


Figura 24. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus TPOX de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.17 Locus D8S1179

Para el marcador D8S1179, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia es el 13, contrario a los alelos 9 y 17, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 18 y Figura 25).

Frecuencias alélicas para locus D8S1179		
Alelos	n	Frecuencia
8	5	0.0125
9	2	0.005
10	54	0.135
11	19	0.0475
12	46	0.115
13	116	0.29
14	90	0.225
15	55	0.1375
16	11	0.0275
17	2	0.005

Cuadro 18. Frecuencias Alélicas para el locus D8S1179, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

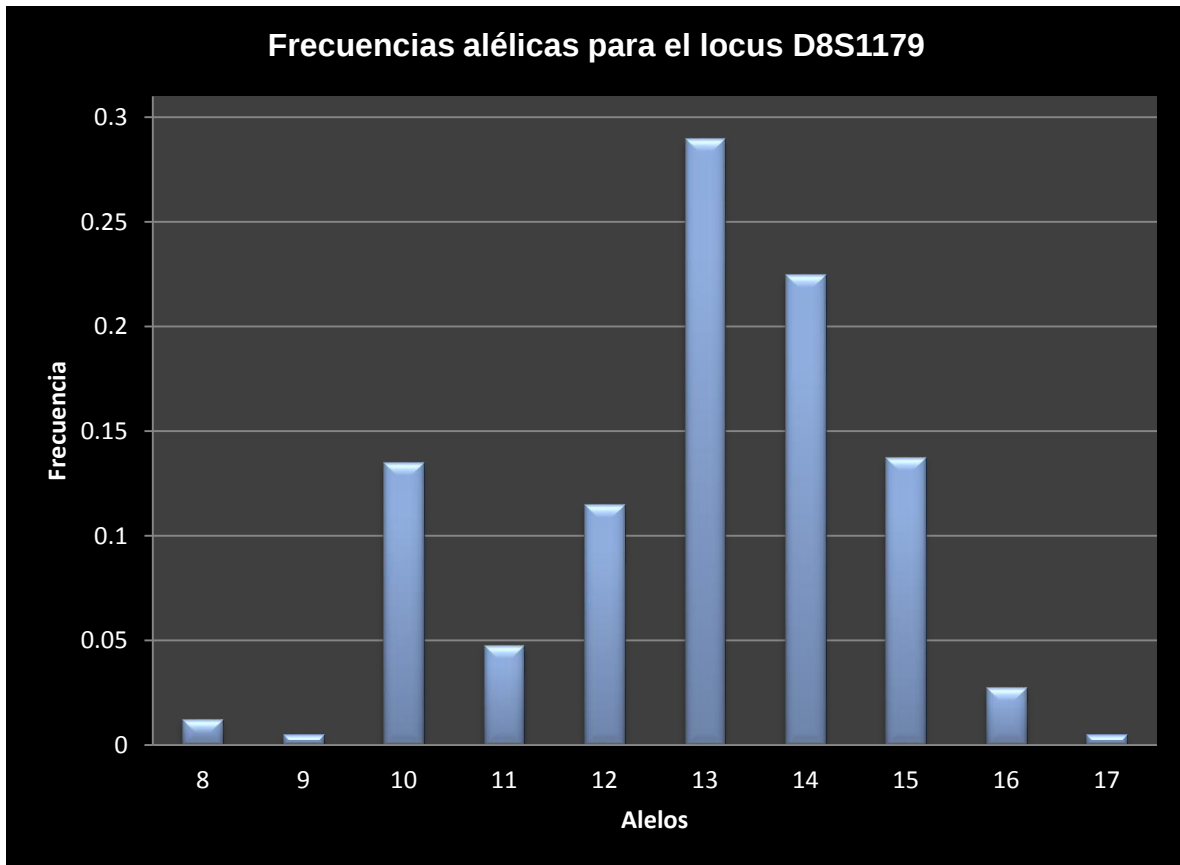


Figura 25. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D8S1179 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.18 Locus D12S391

Para el marcador D12S391, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia es el 19, contrario a los alelos 13 y 26, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 19 y Figura 26).

Frecuencias alélicas para locus D12S391		
Alelos	n	Frecuencia
13	1	0.0025
15	2	0.005
16	13	0.0325
17	24	0.06
17.3	2	0.005
18	64	0.16
18.3	3	0.0075
19	121	0.3025
19.3	7	0.0175
20	94	0.235
21	28	0.07
22	21	0.0525
23	11	0.0275
24	5	0.0125
25	3	0.0075
26	1	0.0025

Cuadro 19. Frecuencias Alélicas para el locus D12S391, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

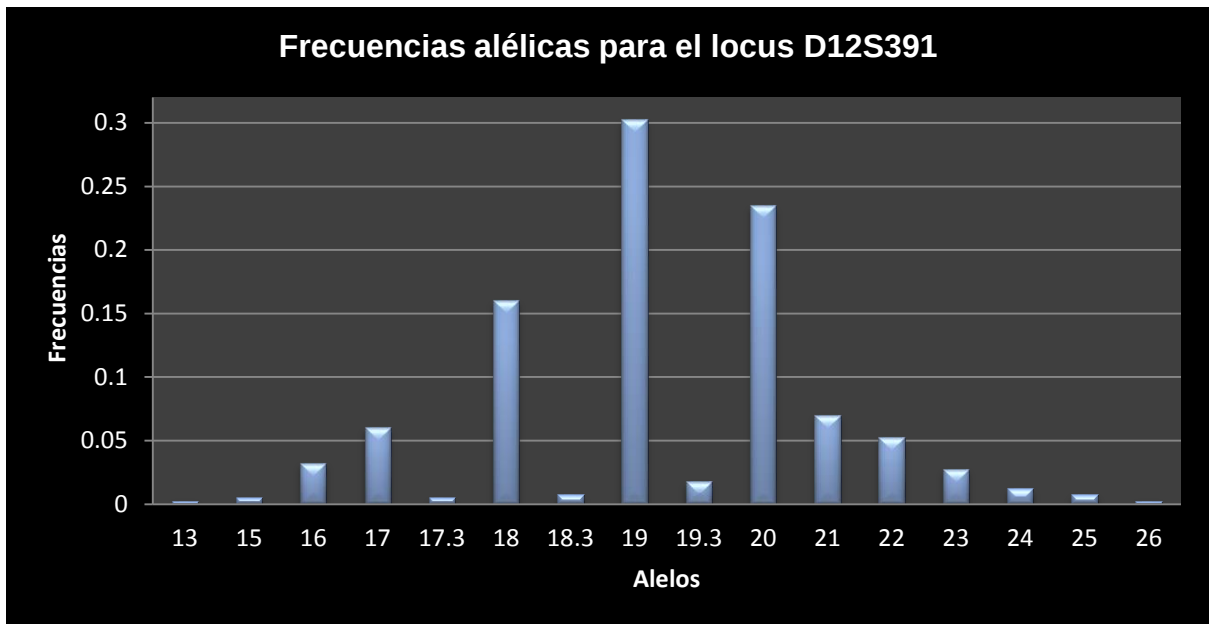


Figura 26. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D12S391 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.19 Locus D19S433

Para el marcador D19S433, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia es el 14, contrario a los alelos 10 y 17, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 20 y Figura 27).

Frecuencias alélicas para locus D19S433		
Alelos	n	Frecuencia
10	1	0.0025
11	4	0.01
12	19	0.0475
12.2	6	0.015
13	85	0.2125
13.2	48	0.12
14	96	0.24
14.2	15	0.0375
15	60	0.15
15.2	38	0.095
16	18	0.045
16.2	9	0.0225
17	1	0.0025

Cuadro 20. Frecuencias Alélicas para el locus D19S433, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

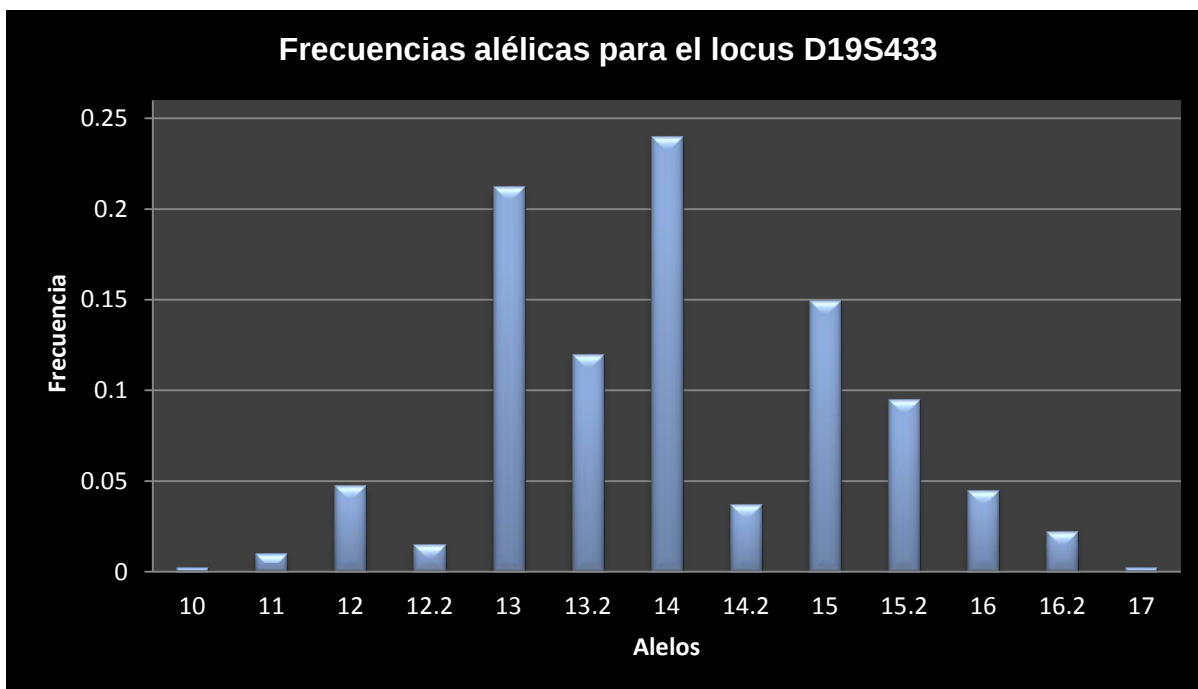


Figura 27. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus D19S433 de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.20 Locus FGA

Para el marcador FGA, se encontró que en la muestra poblacional de la Ciudad de México, el alelo de mayor frecuencia es el 22, contrario a los alelos 17, 22.2 y 30, que son los de menor frecuencia. (Cuadro 21 y Figura 28).

Frecuencias alélicas para locus FGA		
Alelos	n	Frecuencia
17	1	0.0025
18	5	0.0125
19	27	0.0675
20	34	0.085
21	35	0.0875
22	64	0.16
22.2	1	0.0025
23	53	0.1325
24	62	0.155
25	57	0.1425
26	42	0.105
27	16	0.04
28	2	0.005
30	1	0.0025

Cuadro 21. Frecuencias Alélicas para el locus FGA, en la muestra poblacional de la Ciudad de México [N=200]

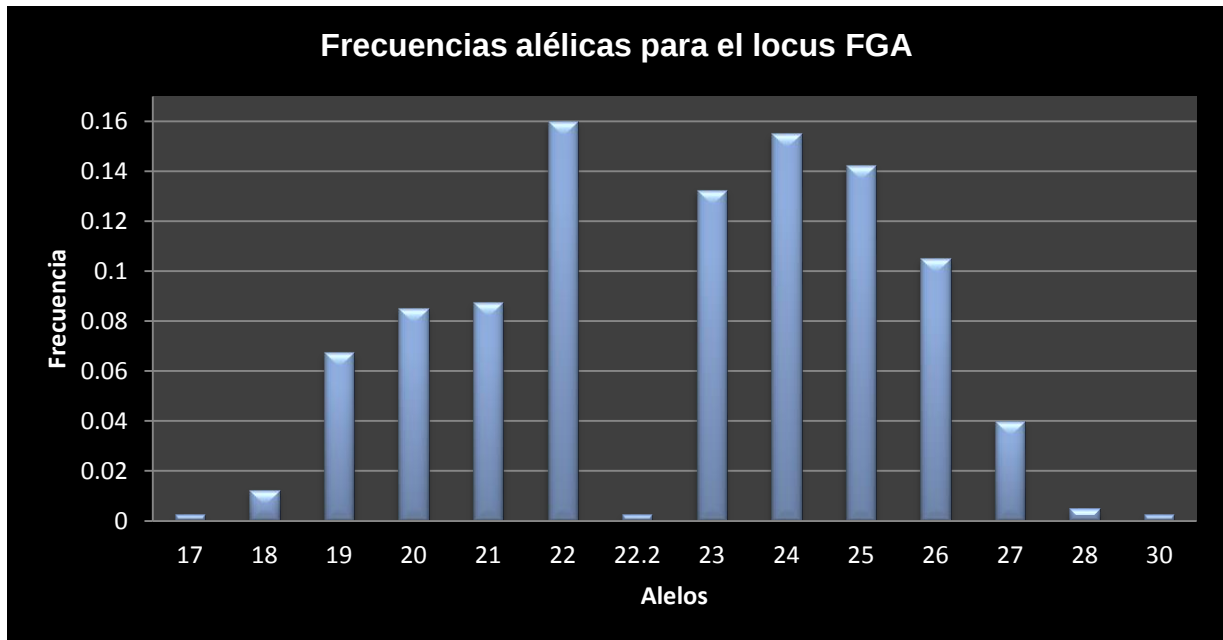


Figura 28. Histograma de las Frecuencias alélicas para el locus FGA de la muestra poblacional de la Ciudad de México

9.1.5.21 Frecuencias alélicas de la población de la Ciudad de México.

El cuadro 22 se puede observar el conjunto de las frecuencias de todos los alelos de cada uno de los loci del panel PowerPlex 21 de Promega en la muestra poblacional de la Ciudad de México.

Se puede observar la presencia de alelos con una frecuencia de 0.0025, que es la menor para todo el panel; algunos de ellos son para el locus D3S1358: 15.2, para el locus D18S51: 11, 24 y 25 y para el locus D19S433: 10 y 17. Esto quiere decir que ese alelo se presentó una vez en la muestra de la población de la Ciudad de México en ese locus en particular.

En este cuadro se puede observar el conjunto de todos los alelos y sus frecuencias en la muestra poblacional estudiada con el panel PowerPlex 21 ® de Promega®.

ALELO	D3S1358	D1S11656	D6S1043	D13S317	Penta E	D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D	TH01	vWA	D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	D8S1179	D12S391	D19S433	FGA
2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0.0325	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.3075	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0.055	0	0	0	0	0.0075	0.3625	0	0	0.005	0.065	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0.0725	0.0275	0.01	0	0	0.005	0.01	0.05	0	0	0.1025	0	0.535	0.0125	0	0	0
8.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0.2425	0.005	0.105	0	0	0.0175	0.1975	0.06	0	0	0.035	0.055	0.055	0.005	0	0	0
9.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2125	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0.0075	0.115	0.0375	0.2025	0	0	0.2475	0.2425	0.005	0	0	0.2675	0.035	0.0275	0.135	0	0.0025	0
11	0	0.0325	0.1075	0.17	0.045	0.28	0.0025	0	0.28	0.1275	0	0	0	0.315	0.5025	0.2475	0.0475	0	0.01	0
11.4	0	0	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0.065	0.1425	0.205	0.1525	0.2775	0.13	0	0.3875	0.1825	0	0	0	0.225	0.26	0.135	0.115	0	0.0475	0
12.1	0	0	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.015	0
13	0.01	0.0925	0.1	0.125	0.0575	0.1125	0.105	0	0.0575	0.165	0	0	0	0.0475	0.08	0	0.29	0.0025	0.2125	0
13.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.12	0
14	0.065	0.12	0.25	0.07	0.0975	0.01	0.1725	0	0.005	0.05	0	0.0525	0	0.0025	0.0025	0	0.225	0	0.24	0
14.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0375	0
14.3	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0.455	0.1425	0.04	0	0.125	0.0025	0.1675	0	0	0.0025	0	0.0625	0	0	0	0	0.1375	0.005	0.15	0
15.2	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.095	0
15.3	0	0.0275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0.29	0.2125	0.0125	0	0.1025	0	0.105	0.025	0	0	0	0.3875	0	0	0	0	0.0275	0.0325	0.045	0
16.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0225	0
16.3	0	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0.1325	0.0625	0.025	0	0.1025	0	0.1825	0.1775	0	0	0	0.29	0	0	0	0	0.005	0.06	0.0025	0.0025
17.3	0	0.15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.005	0	0
18	0.04	0.0025	0.06	0	0.025	0	0.05	0.0425	0	0	0	0.1675	0	0	0	0	0	0.16	0	0.0125
18.3	0	0.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0075	0	0

Cuadro 22. Frecuencias Alélicas para la muestra de la población de la Ciudad de México (N= 200).

Cuadro 22. Continuación. Frecuencias Alélicas para la muestra de la población de la Ciudad de México (N= 200).

19	0.005	0	0.07	0	0.035	0	0.0275	0.2275	0	0	0	0.0375	0	0	0	0	0	0.3025	0	0.0675
19.3	0	0.005	0.005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0175	0	0
20	0	0	0.0175	0	0.0425	0	0.015	0.125	0	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0.235	0	0.085
20.3	0	0	0.0275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0.025	0	0.02	0.0375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.07	0	0.0875
21.3	0	0	0.0925	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0.02	0	0.0125	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0525	0	0.16
22.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0025
22.3	0	0	0.0375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0.005	0	0.005	0.205	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0275	0	0.1325
23.2	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23.3	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0.0025	0	0.0025	0.035	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0125	0	0.155
25	0	0.0025	0	0	0	0	0.0025	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0075	0	0.1425
25.3	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0025	0	0.105
27	0	0	0	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0.0075	0	0	0	0	0	0	0.04
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.09	0	0	0	0	0	0	0.005
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1725	0	0	0	0	0	0	0
29.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.2975	0	0	0	0	0	0	0.0025
30.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.065	0	0	0	0	0	0	0
31.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1225	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.025	0	0	0	0	0	0	0
32.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1375	0	0	0	0	0	0	0
33.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0025	0	0	0	0	0	0	0
33.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.06	0	0	0	0	0	0	0
34.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.005	0	0	0	0	0	0	0

Locus	Valor de χ^2 ⁽¹⁾	Valor de tablas ⁽²⁾ ($\alpha=0.5$)	Conclusión ⁽³⁾
D3S1358	3.68	12.59	Equilibrio
D1S1656	20.47	25.00	Equilibrio
D6S1043	18.31	41.34	Equilibrio
D13S317	21.38	25.00	Equilibrio
Penta E	14.71	18.31	Equilibrio
D16S539	5.58	12.59	Equilibrio
D18S51	21.19	41.34	Equilibrio
D2S1338	14.20	25.00	Equilibrio
CSF1PO	3.94	12.59	Equilibrio
Penta D	14.57	25.00	Equilibrio
TH01	16.76	18.31	Equilibrio
vWA	15.07	19.68	Equilibrio
D21S11	2.91	12.59	Equilibrio
D7S820	8.89	18.31	Equilibrio
D5S818	5.27	12.59	Equilibrio
TPOX	13.05	18.31	Equilibrio
D8S1179	10.94	18.31	Equilibrio
D12S391	6.43	12.59	Equilibrio
D19S433	22.90	18.31	Desequilibrio
FGA	0.73	3.48	Equilibrio

Cuadro 23. Resultados de la prueba de χ^2 para determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada marcador del sistema PowerPlex® 21. (1) Valor de χ^2 : el valor obtenido de χ^2 para cada loci, en la población de la Ciudad de México. (2) Valor de tablas ($\alpha=0.5$): el valor de referencia, con un valor crítico de alfa de 0.5. (3) Conclusión: interpretación del resultado del estadístico de chi-cuadrada.

Estadístico de chi-cuadrada: En la muestra poblacional utilizada, de la Ciudad de México. La frecuencia de los genotipos se calculó a partir de las frecuencias alélicas; utilizando la frecuencia del alelo al cuadrado si se trataba de homocigotos o bien dos veces el producto de las frecuencias del alelo “p” por la del alelo “q” si se trataba de heterocigotos.

	D3S1358	D1S11656	D6S1043	D13S317	Penta E	D16S539	D18S51	D2S1338	CSF1PO	Penta D	TH01	vWA	D21S11	D7S820	D5S818	TPOX	D8S1179	D12S391	D19S433	FGA
PD	0.752	0.966	0.963	0.936	0.984	0.888	0.96	0.947	0.794	0.929	0.817	0.822	0.933	0.871	0.706	0.641	0.918	0.918	0.945	0.969
Hom	0.315	0.125	0.127	0.169	0.086	0.221	0.135	0.154	0.294	0.178	0.278	0.271	0.17	0.236	0.335	0.37	0.189	0.187	0.156	0.12
Het	0.685	0.875	0.873	0.831	0.914	0.779	0.865	0.846	0.706	0.822	0.722	0.729	0.83	0.764	0.665	0.63	0.811	0.813	0.844	0.88
PE	0.4	0.693	0.689	0.61	0.775	0.526	0.673	0.637	0.425	0.594	0.446	0.455	0.609	0.504	0.376	0.339	0.577	0.58	0.634	0.702
PIC	0.636	0.863	0.862	0.809	0.907	0.744	0.85	0.828	0.652	0.797	0.673	0.686	0.811	0.726	0.621	0.58	0.786	0.791	0.826	0.868

Cuadro 24. Resultados de los parámetros estadísticos utilizados en genética forense de manera individual para cada marcador del sistema PowerPlex® 21. PD: Poder de Discriminación, Hom: Homocigosidad, Het: Heterocigosidad, PE: Poder de Exclusión y PIC: Índice de contenido polimórfico.

PD	2.698E+21
PE	0.99999997
Het	0.800
Hom	0.200

Cuadro 25. Resultados de los parámetros estadísticos utilizados en genética forense, de todo el sistema PowerPlex® 21. Poder de discriminación (PD), Poder de exclusión (PE), Heterocigosidad (Het) y Homocigosidad (Hom).

9.1.6 COMPARACIÓN CON PANELES ANTERIORES

PARÁMETROS A COMPARAR	POWERPLEX® 21 de PROMEGA®	POWERPLEX® 16 de PROMEGA	AmpF/STR® Identifiler
NÚM. DE MARCADORES	20	15	15
PD	2.698×10^{21}	$2.94 \times 10^{17(1)}$	1.91×10^{17}
PE	0.99999997	$0.9999983^{(2)}$	0.593
Het.	0.800	-	0.762
Hom.	0.200	-	0.238

Cuadro 25. Parámetros estadísticos de distintos paneles de identificación humana. (1) y (2) Se tomaron de la base de datos creada por Promega® para la población hispano-americana. Tomado de Promega® ⁽⁶⁸⁾

Como se puede observar en el cuadro 25, se comparó el poder de discriminación, el poder de exclusión, la heterocigosidad y homocigosidad, entre POWERPLEX® 16 de PROMEGA, AmpF/STR® Identifiler y POWERPLEX® 21 de PROMEGA®, este último objeto de este estudio. Demostrando que POWERPLEX® 21 tiene un mejor desempeño en la tarea de identificación humana, mostrando un PD, PE, Het y Hom, mayores a los paneles 16 de PROMEGA y AmpF/STR® Identifiler que tienen un menor número de loci en su análisis.

10 DISCUSIÓN

El empleo de la genética forense como herramienta en la impartición de justicia, no debe ser tomado a la ligera pues detrás del análisis genético se encuentran una serie de bases químicas, biológicas y matemáticas, sin las cuales sería inútil fundamentar una teoría mediante el uso de ADN.

El análisis estadístico del comportamiento genético es fundamental para validar que los resultados obtenidos a partir del uso de esta herramienta es verosímil y sustentable.

Es de suma importancia el conocimiento de la frecuencia poblacional de los marcadores genéticos empleados en la determinación de un perfil genético, ya que gracias a esto es posible determinar el índice de parentesco o la probabilidad de coincidencia.

El equilibrio genético se estimó mediante la prueba exacta de X^2 demostrando que uno de los 20 marcadores contenidos en el kit PowerPlex® 21, está fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo esto se puede explicar debido a que este locus tienen un alto contenido de alelos y en algunos sus frecuencias son bajas, por ello se presenta en desequilibrio, lo cual no afecta su uso ya que esto solo se aplicó para una muestra de la población, pero que es representativa de la misma.

Los 20 loci tuvieron un poder de discriminación total de 2.698×10^{21} y un poder de exclusión total de 0.99999997, demostrando que es superior a sus antecesores. Como se puede observar en la cuadro 25, la diferencia del poder de discriminación de este nuevo kit ante sus antecesores es mucho mayor, como se puede apreciar no se alcanzó el poder de discriminación ejemplificado en el cuadro 26 y esto es debido al tipo de población y al número de muestras utilizadas, sin embargo los datos reportados anteriormente demuestran que PowerPlex 21 tiene un poder de discriminación mucho mayor al que ellos poseen, todo esto gracias a un mayor número de marcadores genéticos, empleados en el panel, a que son marcadores estrictamente seleccionados por la casa comercial Promega, para poder dar mejores resultados en la identificación humana.

Las causas principales por las cuales en este estudio no se logró alcanzar un poder de discriminación como el ejemplificado en el cuadro 26 es debido a que la población de estudio es más homogénea, al tratarse de únicamente mexicanos que habitan en la Ciudad de México, en cambio el cuadro muestra un resultado obtenido a partir del análisis de la población latina que habita en Estados Unidos de norte América, que no únicamente está conformada por mexicanos, sino también por argentinos, guatemaltecos, brasileños, etc. Otra razón muy importante es el número de muestras empleadas en el estudio, siendo para este estudio de 200 muestras, en cambio para el análisis presentado en el cuadro 26 se utilizaron 500 muestras lo que aumenta su nivel representativo ante la población y en un punto más concreto aumentan la frecuencia de aquellos alelos, que en una muestra menor, se encontrarían con una frecuencia mínima.

Sistema	Número de Marcadores	Poder de Discriminación
AmpF/STR® SGM Plus® PCR Amplification Kit (Life Technologies)	10	7.2×10^{-14}
CODIS loci	13	5.3×10^{-16}
AmpF/STR® Identifier® PCR Amplification Kit (Life Technologies)	15	6.4×10^{-19}
PowerPlex® 16 System (Promega)	15	3.0×10^{-19}
PowerPlex® 21 System (Promega)	20	7.0×10^{-27}

Tabla 26. Comparación del Poder de Discriminación entre distintos sistemas de identificación. Tomado de Promega® ⁽⁶⁸⁾

El índice de heterocigosidad fue superior al 60% para cada marcador y del 80% para el panel en general, esto significa que el panel tiene una gran utilidad para la identificación humana ya que la población tiene un nivel mayor de heterocigotos,

convirtiendo a la población en poco homogénea, que permite que el nivel de diferenciación entre pobladores sea mayor.

La elaboración y actualización de bases de datos que contengan las frecuencias alélicas de una población es de suma importancia ya que gracias a esto se aumenta la discriminación individual, que es el punto base al realizar una investigación de índole forense.

11 CONCLUSIONES

- Las frecuencias genotípicas de los marcadores: D3S1358, D1S1656, D13S317, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, vWA, D7S820, TPOX, D8S1179, D6S1043, Penta E, TH01, D21S11, D5S818, D12S391 y FGA, del panel PowerPlex® 21 cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, que fue comprobado mediante la prueba de chi cuadrada, sin embargo el marcador restante: D19S433 no cumple con este, debido al gran número de alelos presentes y a su baja frecuencia, lo cual podría cambiar aumentando el número de muestras.
- El poder de discriminación calculado para el nuevo panel PowerPlex® 21 fue superior al de los paneles anteriores como PowerPlex® 16 System o AmpF/STR® Identifier y similar al reportado por Promega® de la población latina
- El nivel de heterocigosidad es del 80% para el panel en general aunado al poder de exclusión de 0.99999997 y al poder de discriminación de 2.698×10^{21} nos indica que el panel PowerPlex® 21 es un mejor panel, para identificación humana, que sus antecesores, haciéndolo una gran herramienta para el sistema de justicia Mexicano.

12 SUGERENCIAS

En la actualidad el Sistema de Justicia Mexicano ha tomado un rumbo hacia la vanguardia, es decir, han actualizado sus sistemas para la impartición de justicia. La genética forense es una de las áreas de mayor progreso dentro del ámbito pericial, aumentando el número de subespecialidades a la vez que se descubren nuevas aplicaciones del análisis del ADN, como el estudio de plantas, animales y microorganismos. Sin embargo; es de suma importancia el control de calidad de estas nuevas tecnologías, ya que esto permitirá que sean aplicadas de manera correcta y que sus resultados sean confiables.

Este estudio, realizado en el Centro de Estudios e investigaciones ANIGEN, tuvo la finalidad de medir la capacidad de discriminación del panel PowerPlex® 21 de Promega® y compararlo con los paneles de generaciones pasadas resultando que este nuevo panel exhibió un poder de identificación y discriminación mayores que sus antecesores, y esto impacta positivamente en los casos de identificación humana y paternidad en el ámbito de la impartición de justicia.

Sin embargo; dada la creciente ola de violencia y el gran número de desaparecidos, así como el desarrollo de bases de datos informáticas como herramienta para la identificación de víctimas, se ha visto que es indispensable la generación de bases de perfiles genéticos con mayor número de loci con el fin de evitar asociaciones fortuitas, en virtud de que en muchas ocasiones sólo está disponible una sola muestra de referencia que puede ser de un familiar cercano (padre, madre, hijo) o más distante (primo, tío, etc); lo que da lugar a que se lleven a cabo asociaciones biológicas que en realidad no existen (asociación entre muestras no relacionadas biológicamente, conocidas como FKAs) dando como resultado una identificación positiva entre muestras no relacionadas realmente.

Por lo anterior, se sugiere el uso de paneles con un número mayor de loci, combinar varios paneles que tengan diferentes loci o bien utilizar el análisis de ADN mitocondrial o cromosoma Y cuando sea posible, con el fin de aumentar el número de marcadores analizados y el poder de discriminación. Esto permitirá que muchos casos de asociaciones fortuitas se resuelvan.

13 REFERENCIAS

1. Jiménez L.F., Merchard H. Biología celular y molecular. México. Pearson; 2003
2. Macarulla J.M. Goñi F.M. Bioquímica humana. Barcelona: Reverte; 1994
3. Lewin B. Genes. 2da ed. Barcelona: Reverte; 1996
4. Klug SW., Cummings. Concepts of genetics. 4ªed. New York: Pretince may; 1994
5. Salamanca F. Citogenética Humana. México: Médica Panamericana; 1990
6. Watson J.D. and Crick F.H.C. Molecular Structure of nucleic acids: a structure for deoxirribosenucleid Acid. Nature. 1953; 171: 737-738
7. Lantigua Cruz A. Introducción a la genética médica. La Habana: Ciencias Médicas; 2004
8. D' Robertis. Biología molecular. 13ª ed. Argentina: El anteneo; 2000
9. Luque J., Herraes A. biología molecular e ingeniería genética. USA: Harcourt; 2001
10. Butler John M. Forensic ADN Typing: biology, technology and genetics of STR markers. 2a Ed. New York: ELSEVIER; 2005
11. Berumen CJ. El análisis del ADN en la Identificación de individuos. México: Ciencia y Desarrollo; 1993.
12. Butler John M. Advanced topics in forensic ADN typing: methodology. USA San Diego California: ELSEVIER; 2011
13. Mendez Aranguren JA., Bravo Roman R., Isea W. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. ALPA. 2005; 13(1):30-42
14. Chakraborty R., Kidd Kenneth K. The utility of ADN typing in forensic work. JSTOR. 1991; 254: 1735-1739
15. Ruitberg C.M., Reeder DJ. And Butler JM. STRBase: a short tandem repeat ADN database for the human identity testing community. Nucleic Acids Research. 2001; 29 (1): 320-322
16. Rey M., Usaquen W., Acosta E., Parra J., Troncoso PJ. Datos poblacionales de los microsatelites de ADN humano D2S1338, D19S433, Penta D, Penta E y SE-33 de la región central colombiana. Acta. Biol. Colomb. 2009; 14 (2):161-168
17. Rondón F., Osorio CV., Peña VA., Garces AH., Barreto G., Diversidad genética en poblaciones humanas de dos regiones colombians. CM. 2008; 39(2):52-60

18. Jeffrey A., Litt M. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *AmJ. Hum Genet.* 1989; 44: 397-401
19. Herzog u., Augustin C., Püschel K. Allele frequencies of six miniSTR markers in a population sample from Modern German and its application on forensic stain analysis. *ScienceDirect.* 2008; 1(1):331-333
20. Promega. Technical manual PowerPlex® 21 System. U.S.A.: Promega; 2011
21. Giovambattista G., Ripoli M.V., Liron J.P., Kienast M.E. Aplicación de las técnicas de polimorfismos de ADN en la resolución de casos de abigeato, identificación individual y determinación de paternidad. *AnalectaVet.* 2001;21 (1): 5-11
22. Edelmann J. Hering S., Michael M., Lessing R., Derchsel D. 16 X-chromosome STR loci frequency data from a German population. *FSI.* 2001; 124: 215-218
23. Sanov I., Nuñez G., Rodríguez A., Espinoza M. y Gonzalez L. Gemelos con diferentes padres: primer caso descrito en Costa Rica. *Rev. Latino. De Derecho médico y medicina legal.* 2004; 8(2): 85-88
24. Kimpton C.P., Gill P., Walton A. Automated ADN profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *Genome Research.* 1993; 3: 13-22
25. Butler J.M. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques.* 2007; 43(4): 1-5
26. Buel E., Schwartz M.B. y LaFountain M.J. Capillary Electrophoresis STR analysis: comparasion to gel-based system. *ASTM international.* 1988; 43(1): 164-170
27. Hill C.R., Kline M.C. Coble M. y Butler J.M. Characteritaton of 26 mini STR loci for improved analysis of degraded ADN samples. *J. Forensic Sci.* 2008; 53(1): 73-80
28. Quinteros R.A., Padilla J., Hernandez Zaragoza G., Valle Y. y Valdez L. Datos poblacionales de cinco STR's de la serie INTERPOL en una población mestiza de occidente de México. *RIC.* 2009; 61(2): 104-109
29. Carey L. y Mitnik L. Trends in ADN forensic analysis. *Biomedical Research.* 2002; 23: 386-397
30. Dixon L.A., Dobbin A.T., Pulker H.K., Butler J.M., Vallone P.M. y Coble M.D. Analysis of artifially degraded ADN using STR's and SNPs-results of a collaborative European (EADNP). *Science Direct.* 2006; 2006; 164:33-44
31. Castagino J.M. Electroforesis capilar. *BCL.* 1999; 33(3): 297-329

32. Gill P., Fereday I., Marling N., Schneider P. The evolution of ADN data bases-Recommendations for new European STR loci. FSI.2006; 156: 242-244
33. Parsons T.J., Huel R., Davoren J., Katzmars K.C., Milos A. Application of novel "mini-amplicon" STR multiplex to high volume casework on degraded skeletal remains. FSI. 2007; 2 (3): 175-179
34. Goor L.H., Koskien M.J, Haeringen W.A. Population Studies of 16 STR loci for forensic purposes. Int J. Legal med. 2011; 125: 111-119
35. Butler J.M. Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. FSI. 2006; 1: 1-48
36. Haley C.S. y Kwoh S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. The Genetic society of Great Britain. 1992; 69(1): 315-324
37. Jeffrys A.J. Wilson V. thein S.L. Hypervariable "minisatelite"regions in human ADN. Nature. 198; 314: 67-73
38. Coble M.D., Hill C.R. Vallone P.M. Butler J.M. Characterization and performance of new miniSTR loci for typing degraded samples. ICS. 2006; 128: 504-506
39. Gangitano D.A., Garofalo M.G. Juvenal G.J. lorente J.A. STR Data for the PowerPlex 16 loci in Buenos Aires population. ASTM. 2002; 418-420
40. Wang W., Jia H., Wang Q. Cai Z. Wei L. STR polymorphisms of forensic loci in the northern han Chinese population. J. Hum. Genet. 2003, 48: 337-341
41. Villalobos R.H. La prueba de paternidad con ADN. Noticon.2010; 18 (49): 40-51
42. Lorente A.J., Vega N. Ma. L. y Rosas S.G. Genética forense, la ciencia al servicio de la justicia. Mensaje bioquímico. 2007; 31: 44-67
43. Pinila G.B., Cubillos K., Rodríguez M. Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ciencias biomédicas. 2008; 6 (9): 65-75
44. Ossa Reyes H. Tascon P.I. Moreno H.A. Frecuencias alélicas de 14 STR's autosómicos en una población de Colombia. NOVA. 2010, 8 (13): 25-29
45. Álvarez Cubero M.J. Martínez G.J. Sainz m. Nuevas aplicaciones en identificación genética. Cuad. Méd. Forense. 2010; 16 (2). 5-18
46. Lucia Hincapre M., Gil M.A., Pico L.A. Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga departamento de Santander. Colombia Médica. 2009; 40 (4): 361-372
47. Huston Kimberly A. Statistical Analysis of STR data. Gene Print. 1998; 1: 14-15
48. Quintero A., Hernández Z.G., Gasamains O. y Rivas S.F. Uso de marcadores polimórficos de ADN. Mediagraphic. 2005; 53(1): 67-68

49. Lincoln P.J., Thompson J. Forensic ADN profiling protocols. USA New Jersey: Humana Press; 1998
50. Carracedo A. Forensic ADN typing protocol. USA New Jersey: Humana Press; 2005
51. Gunn A. Essential forensic biology. 2da Ed. USA New Jersey: wiley and sons; 2004
52. Kobilinsky L. Levine L. and Margolis-Nunnooh. Forensic ADN Analysis. USA New York. Chelsea House, 2007
53. Goodwin William, Linacre A. y Hadi site. An introduction to forensic genetics- Englad: Wiley and sons; 2007
54. Thompson T. and Black S. Forensic Human identification and introduction. USA: CRC Press; 2007
55. Buckleton j., Trigs C.M., Walsh S.J. Forensic ADN Evidence interpretation. USA Florida: CRC Press; 2005
56. Rapley R., Whitehouse D. Molecular forensics. Englad: Wilwey and sons; 2007
57. Hamilton B.M, Population Genetics. USA: Wiley and sons; 2008
58. Kamfung W. Yue-quiring H. Statistical ADN Forensics: theory methods and computation. UK. Wiley and sons; 2008
59. Emigh, T.H. A comparison of tests for Hardy-Weinberg equilibrium. Biometrics. 1980;36:627-642
60. Ohno Y, Sebetan IM, Akaishi S. A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominations. J Forensic Scisoc. 1972; 12: 355-359
61. Johnson P, Williams R. Scott, J. (2004) Crim. Justice Stud. 10
62. Cultek.com. Purificación de ácidos nucleicos. Madrid, España: cultek.com [actualizada 10 de septiembre del 2012; 15 de septiembre del 2012]. Disponible en: <http://www.cultek.com/>
63. Genomasur.com. Ácidos nucleicos. Avellaneda, Argentina: genomasur.com [actualizada 23 de septiembre del 2011; 10 de septiembre del 2012]. Disponible en: <http://genomasur.com/lectu.htm>
64. recursos.cnice.mec.es. Cromosoma. Madrid, España: recursos.cnice.mec.es. [actualizada 03 de marzo del 2010; 10 de septiembre del 2012]. Disponible en: <http://recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/>
65. biologiacellularb.com.ar. Empaquetamiento del ADN. Argentina: biologiacellularb.com.ar [actualizada junio de 2010; 10 de septiembre de 2012]. Disponible en: <http://www.biologiacellularb.com.ar>
66. promega.com. PowerPlex21. U.S.A.: Promega.com [actualizada 2012; 10 de septiembre del 2012]. Disponible en: <http://www.promega.com/>

67. oliba.uoc.edu. Leyendo el libro de la vida. España. oliba.uoc.edu [actualizada 2012; 11 de octubre del 2012]. Disponible en: <http://olibu.uoc.edu/adn/>
68. Ensenberger, M.E. et al. Development of the PowerPlex® 21 System. [Internet] 2012. [cited: year, month, date]. Available from: <http://www.promega.com/resources/articles/profiles-in-dna/2012/development-of-the-powerplex-21-system>
69. Lorente, AJ, Lorente AM. El ADN en la identificación criminal y en la paternidad biológica. España: Comares; 1995
70. Guizar VJ. Genética Médica. 2ª ed. México: el manual moderno; 1994
71. Solari J. A. Genética Humana: fundamentos y aplicaciones en medicina. 3ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2007
72. Cejas Mazzota G. Identificación por ADN. 2ª ed. Argentina. Ediciones Jurídicas Cuyo; 2000

14 ANEXO

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Sr./Sra. _____ de ____ años de edad y que es habitante de la Ciudad de México; manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer la extracción de un volumen de 3 ml de sangre para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado” Análisis genético poblacional de la Ciudad de México utilizando 20 loci STR” con el fin de mejorar el análisis forense en el sistema de justicia mexicano.

He sido también informado/a de que mis datos personales serán protegidos y no se utilizarán con ningún otro fin que no sea el de la investigación, antes mencionada.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

México DF, a 20 de junio de 2012.

Sr./Sra